

**Struktur und Funktion der 20S Proteasomen
aus Organen *Listeria monocytogenes* infizierter Mäuse**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Britta Katharina Strehl
geboren am 19.04.1975 in Lüdenscheid

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
 2. Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter
 3. PD Dr. Ulrich Steinhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2005

Zusammenfassung

Das Proteasomensystem der Zelle ist für die Degradation von Proteinen verantwortlich und spielt eine zentrale Rolle bei der Generierung von Epitopen, die auf MHC-Klasse-I Molekülen den cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) präsentiert werden. Die Stimulation von Zellen mit Interferon- γ (IFN γ) führt zu der Bildung von Immunoproteasomen, die im Vergleich zu den konstitutiven Proteasomen eine verbesserte Generierung vieler MHC-Klasse-I Epitope aufweisen. In gesunden Mäusen werden Immunoproteasomen vorwiegend in den lymphatischen Geweben exprimiert, wohingegen nicht-lymphatische Gewebe hauptsächlich konstitutive Proteasomen enthalten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur und Funktion von Proteasomen aus verschiedenen murinen Organen vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* untersucht. Damit wurde zum ersten Mal in einem Infektionsmodell die Struktur der Proteasomen mit ihrer physiologischen Funktion verbunden.

Die Funktion der isolierten Proteasomen wurde durch *in vitro* Prozessierung von drei oligomeren Peptidsubstraten analysiert und die Prozessierungsprodukte mittels HPLC-ESI-Ionenfalle massenspektrometrisch identifiziert sowie quantifiziert. Nach Optimierung der Auswertemethodik konnte gezeigt werden, dass die Proteasomen, die aus den nicht-lymphatischen Organen isoliert wurden, signifikant mehr MHC-Klasse-I Epitop und Epitop-precursor nach der Infektion produzierten als vorher. Dies galt sowohl für die Produkte aus dem murinen Hsp60-Substrat als auch aus dem viralen pp89-Substrat und einem erstmalig untersuchten bakteriellen Substrat, dem LLO-Substrat. Die gesteigerte Generierung der immunrelevanten Fragmente ging einher mit der deutlichen Zunahme der Immunoproteasomen in den nicht-lymphatischen Geweben, wie durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Westernblotanalyse nachgewiesen werden konnte. Zudem wurden bei den aus Leber isolierten Proteasomen Hinweise auf eine nach der Infektion erhöhte posttranslationale Modifikation mit dem Monosaccharid N-Acetylglucosamin gefunden. In den lymphatischen Geweben veränderte sich der hohe Anteil der Immunoproteasomen sowie die proteasomale Funktion nach der Infektion nicht. Die durch die Infektion ausgelöste Induktion der Immunoproteasomen war unabhängig von der Präsenz der Erreger in den jeweiligen Organen. Die parallel durchgeführten Analysen von Cytokinrezeptor-defizienten Mäusen ergaben keinen Einfluss von Tumor Nekrose Faktor- α auf die Expression der Immunoproteasomen, aber eine eindeutige Abhängigkeit von IFN γ . Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass nach einer Infektion ausgeschüttetes IFN γ dazu führt, dass auch die nicht-lymphatischen Organe Immunoproteasomen bilden, um so durch eine verbesserte Epitoppräsentation die Erkennung und Beseitigung infizierter Zellen durch die CTLs zu erleichtern und daher einer weiteren Ausbreitung des Erregers effizient entgegenzuwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine detaillierte Analyse der massenspektrometrischen Daten hinsichtlich des Schnittverhaltens der konstitutiven und Immunoproteasomen durchgeführt. Hierfür wurde die Verhältnisbildung zwischen sogenannten Antitopen, die durch eine Spaltung des Peptidsubstrates innerhalb der Epitopsequenz entstehen, und den immunrelevanten Produkten etabliert. Die Auswertung ergab, dass die Immunoproteasomen der lymphatischen Organe und der nicht-lymphatischen Gewebe nach der Infektion zwar dieselben Spaltstellen nutzten wie die konstitutiven Proteasomen, aber andere Schnittstellenpräferenzen besaßen. Zudem degradierten die Immunoproteasomen die Substrate deutlich schneller. Dies bedeutet, dass die Immunoproteasomen nach einer Infektion durch schnellere und veränderte Nutzung bestehender Spaltstellen an der verbesserten Epitoppräsentation beteiligt sind.

Abstract

The proteasome system of the cell is responsible for the degradation of proteins and plays a central role in the generation of epitopes which are presented to cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) on MHC-class-I molecules. The stimulation of cells by interferon-gamma (IFN γ) leads to the formation of immunoproteasomes that show an improved generation of many MHC-class-I epitopes compared to constitutive proteasomes. In healthy mice, immunoproteasomes are mainly expressed in the lymphatic tissues, whereas the non-lymphatic organs predominantly contain constitutive proteasomes. In this project the structure and function of proteasomes derived from several murine organs before and at different times after infection with the intracellular bacteria *Listeria monocytogenes* were investigated. Therefore for the first time the structure of proteasomes was correlated with their physiological function in an infection model.

The function of isolated proteasomes was analyzed through in vitro processing of three oligomeric peptide substrates and the processing products were identified and quantified by HPLC-ESI-ion trap mass spectrometry. After optimization of the theoretical analysis it could be shown that proteasomes isolated from the non-lymphatic organs produce significantly more MHC-class-I epitopes and epitope precursors after than before the infection. This applied to the products of the murine Hsp60-substrate as well as of the viral pp89-substrate and also for the products of the bacterial LLO-substrate which was studied for the first time. The enhanced generation of the immuno-relevant fragments was coupled to the clear induction of immunoproteasomes in non-lymphatic tissues as demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis and western blot analysis. In addition an increase of the posttranslational modification with the monosaccharide N-acetylglucosamine could be detected in liver-derived proteasomes after infection. In the lymphatic tissues neither a change in the proteasomal function nor in the high amounts of immunoproteasome could be detected post infection. The induced formation of immunoproteasomes after infection was independent of the presence of pathogens in the studied organs. The additional analysis of cytokine receptor deficient mice revealed that tumor necrosis factor- α does not influence the expression of immunoproteasomes whereas the induction is definitely dependent on IFN γ . The results of this project lead to the conclusion that, after infection, secreted IFN γ induces immunoproteasomes also in the non-lymphatic organs in order to facilitate recognition and elimination of infected cells by improved epitope presentation. Thus a further dissemination of the pathogens should be efficiently antagonized.

Furthermore, a detailed analysis of the mass spectrometry data was established according to the cleavage site usage of constitutive and immunoproteasomes. For this purpose ratios between so-called antitopes, which are generated by a cleavage inside of the epitope

sequence, and the immuno-relevant products were calculated. The result was that immunoproteasomes of the lymphatic tissues and the non-lymphatic organs after infection used the same cleavage sites however with different preferences. Immunoproteasomes additionally degraded the substrates much faster. This means that immunoproteasomes are involved in improved epitope generation after infection by faster and changed usage of existing cleavage sites.

Schlagworte

20S Proteasom, Immunoproteasom, *Listeria monocytogenes*, Mausmodell, lymphatische Organe, nicht-lymphatische Organe, IFN γ , TNF α , Antigenprozessierung, MHC-Klasse-I Epitop, Antitop, LLO, Hsp60, pp89, HPLC-ESI-Ionenfalle, Massenspektrometrie, posttranslationale Modifikation, N-Acetylglucosamin, O-GlcNAc

Keywords

20S proteasome, immunoproteasome, *Listeria monocytogenes*, mouse model, lymphatic organs, non-lymphatic organs, IFN γ , TNF α , antigen processing, MHC-class-I epitope, antitope, LLO, Hsp60, pp89, HPLC-ESI-ion trap, mass spectrometry, posttranslational modification, N-acetylglucosamine, O-GlcNAc

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Schlagworte	6
Keywords	6
1 EINLEITUNG	10
1.1 Struktur und Funktion des Proteasomensystems	10
1.1.1 Strukturelle Komponenten des Proteasomensystems.....	10
1.1.2 Strukturvariabilität durch posttranslationale Modifikationen	12
1.1.3 Generierung der MHC-Klasse-I Epitope und ihrer Precursor durch das Proteasomensystem..	15
1.2 Präsentation von Epitopen auf MHC-Klasse-I Molekülen	18
1.3 Das murine Infektionsmodell mit <i>Listeria monocytogenes</i>	20
1.3.1 Verlauf der Listeriose.....	20
1.3.2 Die MHC-Klasse-I Epitope von <i>Listeria monocytogenes</i>	22
1.4 Massenspektrometrische Analyse der <i>in vitro</i> Prozessierungsexperimente	23
1.5 Zielstellung.....	26
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	27
2.1.2 Antikörper.....	29
2.1.3 Nukleinsäuren	29
2.1.4 Enzyme	31
2.1.5 Kits.....	31
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.7 Geräte	31
2.1.8 Software.....	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Mäuse.....	33
2.2.1.1 Mausstämme und <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion	33
2.2.1.2 Bestimmung der Bakterientiter in Organen	33
2.2.1.3 Herstellung der Organhomogenate für die Präparation von 20S Proteasomen.....	33
2.2.1.4 Herstellung der Organhomogenate für Cytokinbestimmung	34
2.2.2 Biochemische Methoden.....	34
2.2.2.1 Präparation von 20S Proteasomen	34
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.2.2.3 Proteinfällung	35
2.2.2.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Aktivitätstest im Gel.....	35
2.2.2.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	35
2.2.2.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schagger/vonJagow	36
2.2.2.7 Mini-2D-Gelelektrophorese.....	36
2.2.2.8 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran	37
2.2.2.9 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen.....	37
2.2.2.10 Densitometrische Auswertung Coomassie-gefärbter 2D-Gele	38
2.2.2.11 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	38
2.2.2.12 Zuckeridentifizierung mittels Lektinen	38
2.2.2.13 Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten.....	39
2.2.2.14 Proteolytische Prozessierung von Modellpeptiden	39
2.2.2.15 Analytische Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	40
2.2.3 Massenspektrometrie	40
2.2.3.1 Massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte.....	40
2.2.3.2 Identifizierung der Prozessierungsprodukte: Erstellung von Schnittkarten.....	40
2.2.3.3 Auswertung und Kinetik der Prozessierungsprodukte.....	41
2.2.3.4 Excel-Programm zur statistischen Analyse der Produktgenerierung.....	41
2.2.3.5 Erstellung der Eichreihen für ausgewählte Prozessierungsprodukte	42
2.2.3.6 Epitop-Antitop Auswertung durch Verhältnisbildung.....	42

2.2.3.7	Proteinidentifizierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie	43
2.2.4	Immunologische Methoden	43
2.2.4.1	Spezifische Protein- und Zuckeridentifizierung mittels Westernblotanalyse	43
2.2.4.2	Immunopräzipitation von radioaktiv markierten 20S Proteasomen	44
2.2.4.3	Immunofluoreszenz	45
2.2.4.4	Bio-Plex Immunoassay zur Cytokinbestimmung aus Serum und den Organhomogenaten	45
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.5.1	RNA-Isolation aus RMA-Zellen	45
2.2.5.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA	45
2.2.5.3	Amplifikation von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion	46
2.2.5.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	46
2.2.5.5	DNA-Gelelektrophorese	46
2.2.5.6	Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen und Agarosegelen	46
2.2.5.7	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	47
2.2.5.8	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA	47
2.2.5.9	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA	47
2.2.5.10	Präparation von Plasmid-DNA	47
2.2.5.11	Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration	48
2.2.5.12	Zusammenlagerung einzelsträngiger siRNA	48
2.2.6	Zellkultur	48
2.2.6.1	Kultur von RMA-Zellen	48
2.2.6.2	Einfrieren und Auftauen von RMA-Zellen	48
2.2.6.3	Lyse der RMA-Zellen für Präparation von 20S Proteasomen	49
2.2.6.4	Elektroporation mit siRNA	49
2.2.6.5	Markierung von Proteinen in RMA-Zellen mit ¹⁴ C	49
2.2.6.6	Markierung von Proteinen in RMA-Zellen mit ³⁵ S	49
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Charakteristika der <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion in Mäusen	51
3.2	Funktionsanalyse der aus Gewebe isolierten Proteasomen	53
3.2.1	Reinheit der Proteasomenpräparationen	53
3.2.2	Massenspektrometrische Identifizierung der Produkte aus <i>in vitro</i> Prozessierungsexperimenten	57
3.2.3	Statistische Bearbeitung und Auswertung der Rohdaten	59
3.2.4	Auswertung der Prozessierungsexperimente	60
3.2.4.1	<i>In vitro</i> Prozessierung des LLO-Substrates durch Proteasomen aus den Organen der Wildtypmäuse	60
3.2.4.2	<i>In vitro</i> Prozessierung des LLO-Substrates durch Proteasomen aus den Organen der Rezeptor-defizienten Mäuse	63
3.2.4.3	<i>In vitro</i> Prozessierung des Hsp60-Substrates und des pp89-Substrates	64
3.3	Struktur der aus den Geweben isolierten Proteasomen	66
3.3.1	Gewebehomogenate im Westernblot	66
3.3.2	Zusammensetzung der aus Geweben isolierten 20S Proteasomen	67
3.3.2.1	Die Zusammensetzung der Proteasomen aus den Geweben der Wildtypmäuse	67
3.3.2.2	Die Zusammensetzung der Proteasomen aus den Geweben der Rezeptor-defizienten Mäuse	71
3.4	Struktur- und Funktionsanalyse der Proteasomen aus ausgewählten Gewebezelltypen	73
3.5	Funktionelle Unterschiede zwischen konstitutiven und Immunoproteasomen	76
3.6	Posttranslationale Modifikation der Proteasomen mit O-GlcNAc – Erste Hinweise	80
4	DISKUSSION	85
4.1	Modifikation der Proteasomen mit O-GlcNAc	85
4.2	Struktur- und Funktionsvergleich der Proteasomen aus den verschiedenen Organen	90
4.3	Regulation der Proteasomen durch IFN γ und TNF α	97
4.4	Detaillierte Auswertung des Schnittverhaltens von konstitutiven und Immunoproteasomen	100
5	LITERATUR	106
	Abkürzungen	121
	Publikationen	124

Danksagung.....	125
Erklärung.....	127

1 EINLEITUNG

1.1 Struktur und Funktion des Proteasomensystems

Das Proteasomensystem ist ubiquitär in Archea sowie Eukaryoten verbreitet, und zudem werden sogar in den Prokaryonten *Rhodococcus* und *Mycobacterium* einige Komponenten des Proteasomensystems exprimiert (Dahlmann et al., 1989; De Mot et al., 1999). Die Hauptaufgabe des Systems ist die Degradation nicht benötigter Proteine. Aus diesem Grund ist das Proteasomensystem eng mit lebenswichtigen Prozessen wie Zellteilung, Differenzierung, Transkription, Stressantwort und Apoptose verknüpft (Coux et al., 1996; Schwartz und Ciechanover, 1999). Eine weitere wichtige Funktion ist der Abbau neusynthetisierter, aber fehlgefalteter Proteine (Schubert et al., 2000). Zusätzliche immunologische Bedeutung erlangt das Proteasomensystem in Vertebraten, da einige der Degradationsprodukte als Liganden, nachfolgend als Epitope bezeichnet, auf dem „Major Histocompatibility Complex“ der Klasse I (MHC-Klasse-I) fungieren (Kloetzel und Ossendorp, 2004). Durch die spezifische Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit diesem Komplex aus Epitop und MHC-Klasse-I Molekül werden die cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs) angeregt, infizierte oder entartete Zellen zu lysieren.

Das Proteasomensystem ist im Cytosol und Kern der Zelle lokalisiert. Dies setzt voraus, dass der Proteinabbau streng reguliert ist, um eine unspezifische Degradation sämtlicher Proteine des Cytosols und des Kerns zu vermeiden. Eine wichtige Rolle hierbei spielt die Markierung von Proteinen mit Polyubiquitin, welches sie als proteasomale Substrate kennzeichnet. Die Enzyme der dreistufigen Ubiquitinierungskaskade binden das 76 Aminosäuren lange, globuläre Ubiquitin kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des zu degradierenden Proteins. Ist die N-terminale Aminosäure für die Erkennung des zu degradierenden Proteins durch die Enzyme der Ubiquitinierungskaskade verantwortlich, wird von der N-Terminus-Regel gesprochen (Bachmair et al., 1986; Varshavsky, 1997). In den darauf folgenden enzymatischen Schritten werden weitere Ubiquitinmoleküle an das erste Ubiquitin angeheftet, wodurch eine Polyubiquitininkette entsteht (Pickart, 2004; Weissman, 2001).

1.1.1 Strukturelle Komponenten des Proteasomensystems

Das 26S Proteasom stellt die vorherrschende katalytisch aktive Form des Proteasomensystems in der Zelle dar. Es setzt sich aus dem 20S Proteasom und zwei 19S Regulatoren zusammen, die sich ATP-abhängig an zwei Seiten des 20S Proteasoms anlagern (Peters et al., 1993; Yoshimura et al., 1993). Die Funktion des 19S Regulators besteht in der Erkennung der

ubiquitinierten proteasomalen Substrate (Deveraux et al., 1994; Young et al., 1998), ihrer Deubiquitinierung, Entfaltung sowie schließlich ihrer Translokation in das 20S Proteasom (Glickman und Ciechanover, 2002). Der 19S Regulator hat ein Molekulargewicht von 700 kDa und wird aus 17 Untereinheiten gebildet, die in den zwei Subkomplexen „Lid“ und „Base“ angeordnet sind (Ferrell et al., 2000) (**Abb. 1A**). Während den Lid-Untereinheiten noch keine spezifischen Funktionen zugeordnet werden konnten, zeigen die ATPase-Untereinheiten des Base Chaperon-ähnliche Aktivität und unterstützen damit die energieabhängige Entfaltung und Translokation des Substrates (Braun et al., 1999).

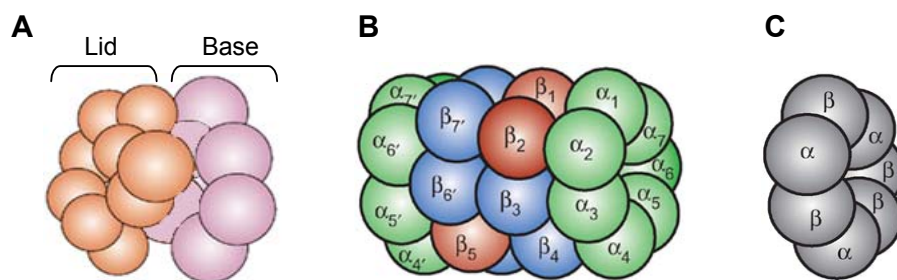


Abb. 1: Komplexe des Proteasomensystems. (A) 19S Regulator: orange – Lid-Untereinheiten; violett – Base-Untereinheiten. (B) 20S Proteasom: grün – α -Untereinheiten; rot – proteolytisch aktive β -Untereinheiten; blau – inaktive β -Untereinheiten. (C) PA28. Die einzelnen Komplexe ergeben in der dargestellten Kombination das Hybrid-Proteasom 19S-20S-PA28. Das 26S Proteasom hat die Anordnung 19S-20S-19S. Daneben existiert das Proteasom als PA28-20S-PA28 Komplex in der Zelle. (Die Abbildung ist eine Kombination aus (Kloetzel, 2001; Kloetzel, 2004; Tanahashi et al., 2000))

Das 20S Proteasom, der proteolytisch aktive Kern des 26S Proteasoms, besteht aus zweimal 14 verschiedenen Untereinheiten, von denen die kleinste Untereinheit, β_2 , ein Molekulargewicht von 21 kDa und die größte Untereinheit, β_6 , eines von 30 kDa aufweist. Auf Grund von Sequenzhomologien werden sie zu sieben α -Untereinheiten und sieben β -Untereinheiten zusammengefasst und durchnummeriert (Tanaka et al., 1992). Vier heptamere Ringe, die entweder jede der α -Untereinheiten oder jede der β -Untereinheiten enthalten, ergeben mit $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie die zylinderförmige Struktur des 20S Proteasoms (**Abb. 1B**). Die aktiven Zentren der proteolytisch aktiven Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 sind zu den Zentren der β -Ringe hin ausgerichtet (Groll et al., 1997; Lowe et al., 1995). Sie enthalten als Nukleophil die Hydroxylgruppe des N-terminalen Threoninrestes (Lowe et al., 1995) und gehören daher zu den aminoterminalen nukleophilen Proteasen (Groll und Huber, 2003). Die katalytischen Untereinheiten werden als inaktive Vorläufer mit N-terminalen Propeptiden exprimiert, welche nach abgeschlossener Assemblierung des 20S Proteasoms autokatalytisch abgespalten werden. Die reaktiven Threoninreste sind also erst dann zugänglich, wenn sie vom Cytosol durch die proteasomale Zylinderstruktur getrennt sind. Neben der Substratubiquitinierung vermeiden also auch die Propeptide sowie die Struktur des 20S Proteasoms eine unspezifische Degradation der cytosolischen Proteine (Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidtke et al., 1996).

Die N-Termini der α -Untereinheiten verschließen die Eingänge des 20S Proteasoms (Groll et al., 1997). Eine einzige Punktmutation im N-terminalen Bereich von $\alpha 3$ führt jedoch dazu, dass die N-Termini nicht mehr über den Eingängen angeordnet sind und sich daher ein Kanal in das Innere des 20S Proteasoms öffnet (Groll et al., 2000). Ein vergleichbarer Effekt ist in der Röntgenkristallstrukturanalyse zu beobachten, wenn das 20S Proteasom mit einem dem Proteasomen-Aktivator 28 (PA28) homologen Komplex aus *Trypanosoma* inkubiert wird (Whitby et al., 2000). Der ca. 200 kDa große PA28-Komplex wird wahrscheinlich durch drei PA28 α - und vier PA28 β -Untereinheiten gebildet, die sich in einer Ringstruktur an die α -Heptamere des 20S Proteasoms anlagern (Rechsteiner et al., 2000) (**Abb. 1C**). Neben den 26S Proteasomen existieren demnach ebenfalls 20S Proteasomen, die über die α -Ringe mit zwei PA28-Komplexen verbunden sind. Zusätzlich liegen in den Zellen bis zu 20% aller 20S Proteasomen als Hybrid-Komplex mit PA28 auf der einen und 19S Regulator auf der anderen Seite vor (Cascio et al., 2002; Hendil et al., 1998; Noda et al., 2000; Tanahashi et al., 2000).

1.1.2 Strukturvariabilität durch posttranslationale Modifikationen

Aus Geweben oder Zellen gewonnene 20S Proteasomenpräparationen sind nicht in sich homogen, sondern enthalten jeweils eine Mischung von 20S Proteasomen. Das zeigt sich im proteasomalen Elutionsverhalten bei der Anionenaustausch-Chromatographie, in der aktive 20S Proteasomen in bis zu sechs separaten Fraktionen eluieren. Wahrscheinlich durch andere Oberflächenladungen können daher sogenannte proteasomale Subtypen unterschieden werden. (Dahlmann et al., 2001; Dahlmann et al., 2000). Die Auftrennung in der zweidimensionalen (2D-) Gelelektrophorese lässt zudem erkennen, dass eine Untereinheit mit mehreren unterschiedlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten vorliegen kann wie in **Abb. 2** dargestellt (Kuckelkorn et al., 2002). Eine Erklärung dafür können posttranslationale Modifikationen bieten.

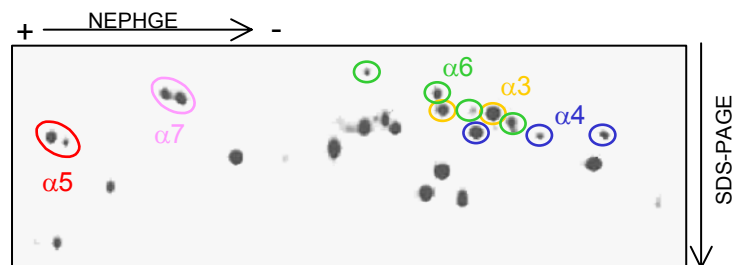


Abb. 2: Unterschiedliche Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der gleichen proteasomalen Untereinheiten. Gezeigt sind aus murinem Dünndarm isolierte und in der 2D-Gelelektrophorese separierte 20S Proteasomen. Die erste Dimension trennt nach isoelektrischem Punkt (NEPHGE – „Nonequilibrium pH Gradient Electrophoresis“); die zweite Dimension trennt nach Molekulargewicht (SDS-PAGE – denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese). Die Pfeile geben die Trennrichtungen der Elektrophoresen an. Durch Massenspektrometrie identifizierte gleiche Untereinheiten sind in den gleichen Farben markiert. (Abb. nach (Kuckelkorn et al., 2002))

Reversible posttranslationale Modifikationen führen zu strukturellen Änderungen und regulieren dadurch die Eigenschaften und Funktionen der Proteine (Seo und Lee, 2004). Auch für das Proteasomensystem sind posttranslationale Modifikationen beschrieben worden, die allerdings noch nicht mit den oben gezeigten multiplen Spots oder Subtypen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Hierzu gehören die N-terminale Acetylierung von $\beta 3$, $\beta 4$, sämtlicher α -Untereinheiten und von zwölf Untereinheiten des 19S Regulators sowie eine für die 19S Regulator-Untereinheit Rpt2a nachgewiesene N-terminale Myristoylisierung (Kimura et al., 2003; Kimura et al., 2000). Oxidativer Stress kann weitere Modifikationen hervorrufen: So wurde für die aus verschiedenen Rattenorganen isolierten proteasomalen Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 4$ gezeigt, dass diese nach oxidativem Stress zusätzliche Carbonylgruppen enthalten wie das ungesättigte Aldehyd HNE (4-Hydroxy-2-Nonenal) (Bulteau et al., 2001; Okada et al., 1999). Andere Untersuchungen ergaben, dass bei mildem oxidativen Stress Cysteinreste der Proteasomen eine reversible S-Glutathionylierung eingehen (Demasi et al., 2001; Demasi et al., 2003). Phosphorylierungen wurden an $\beta 6$ (Wehren et al., 1996), an den α -Untereinheiten, mit Ausnahme von $\alpha 1$, (Fernandez Murray et al., 2002; Iwafune et al., 2002; Mason et al., 1996) sowie an den Untereinheiten des 19S Regulators S4, S6, S7 und S12 (Mason et al., 1998) detektiert.

Über die Funktionen dieser Modifikationen kann bislang nur spekuliert werden: Für die N-Acetylierung lässt sich ein Schutz der N-Termini vor cytosolischen Aminopeptidasen postulieren, und die N-Myristoylisierung könnte über Interaktion mit Membranen oder Proteinen an der Lokalisation der 26S Proteasomen beteiligt sein. N-Acetylierungen, oxidative Modifikationen und Phosphorylierungen werden auch mit Änderungen der proteasomalen Aktivität in Verbindung gebracht; die Ergebnisse stammen jedoch aus weitgehend unphysiologischen Versuchen mit fluorogenen Substraten und sind außerdem sehr widersprüchlich (Bulteau et al., 2001; Demasi et al., 2001; Demasi et al., 2003; Iwafune et al., 2002; Mason et al., 1996). Funktionelle Hinweise gibt es indes für die Phosphorylierung der $\alpha 3$ und $\alpha 7$ Untereinheiten basierend auf dem Einsatz von Interferon- γ (IFN γ) in der Zellkultur. IFN γ -Behandlung resultiert in der Reduktion der proteasomalen Phosphorylierung, was zur Abnahme der Menge an 26S Proteasomen und zur gleichzeitigen Zunahme von PA28-20S-PA28 führt (Bose et al., 2001; Bose et al., 2004). Dies kann als erster Hinweis auf eine physiologisch relevante Regulation der Proteasomen durch posttranslationale Modifikationen verstanden werden, über die die Zelle auf komplexe Situationen wie z.B. eine Infektion reagieren könnte.

Eine posttranslationale Modifikation, der bislang wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde, ist die nukleo-cytosolische Glycosylierung. Im Gegensatz zu der im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat stattfindenden Anheftung von komplexen Kohlenhydratverbindungen, die an Proteinfaltung, Qualitätskontrolle und Translokation zur Zelloberflächen

beteiligt sind (Helenius und Aebi, 2004), besteht die nukleo-cytosolische Glycosylierung aus der Übertragung nur eines einzigen Monosaccharids: des β -N-Acetylglucosamins (GlcNAc), welches über die Hydroxylgruppe von Serin- und Threoninresten an native Proteine gebunden wird (O-GlcNAc) (Holt und Hart, 1986; Torres und Hart, 1984). Diese Modifikation ist reversibel und wird durch zwei spezifische nukleo-cytosolische Enzyme reguliert, die in Metazoa konserviert sind. Die N-Acetylglucosaminidase (NAG) ist für die hydrolytische Abspaltung des O-GlcNAc zuständig, während die O-GlcNAc-Transferase (OGT) das Monosaccharid von UDP-GlcNAc auf die Proteine überträgt (Gao et al., 2001; Wells et al., 2002). Im Gegensatz zu der im ER lokalisierten Glycosylierung ist für diesen Vorgang bislang keine Konsensussequenz bekannt (Kreppel et al., 1997; Kreppel und Hart, 1999; Lubas et al., 1997). Interessanterweise konnte jedoch für einige Proteine nachgewiesen werden, dass O-GlcNAc an Serin- und Threoninreste bindet, die selbst oder deren Nachbaraminosäuren mit Phosphatgruppen modifiziert werden können. Zu diesen Proteinen gehören der Östrogenrezeptor- β (Cheng et al., 2000), die RNA-PolymeraseII (Comer und Hart, 2001), der Transkriptionsfaktor c-Myc (Kamemura et al., 2002) und die CaseinkinaseII (Matsuoka et al., in prep). Generell scheint der Phosphorylierungsgrad zuzunehmen, wenn der Glycosylierungsgrad in der Zelle reduziert wird (Boehmelt et al., 2000; Lefebvre et al., 1999; Lefebvre et al., 2003). Diese Beobachtung und die Entdeckungen, dass die OGT mit Phosphatasen assoziiert ist (Wells et al., 2004), sowie dass O-GlcNAc in die Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist (Zachara und Hart, 2004), unterstützen das sogenannte Yin-Yang-Modell, welches eine reziproke Regulation von Glycosylierung und Phosphorylierung vorschlägt (Hart et al., 1995; Slawson und Hart, 2003).

Die Herausforderung bei der Untersuchung posttranslationaler Modifikationen liegt darin, diese in einen physiologisch relevanten Kontext zu setzen. Unter experimentellen artifiziellen Bedingungen, wie sie bei Deletionsmutanten oder in *in vitro* Experimenten gegeben sind, ist der Nachweis einer Modifikation oft möglich, da der Anteil der modifizierten Proteine künstlich erhöht ist. Wird aber von einer *in vivo* Situation ausgegangen, erschweren mehrere Aspekte die Identifizierung und Charakterisierung: Wegen der regulatorischen Funktion von posttranslationalen Modifikationen liegt innerhalb der Zelle meist nur ein geringer Anteil eines Proteins entsprechend verändert vor. Es sind also hochsensitive Nachweismethoden erforderlich, oder es muss ein genaues Wissen über die Regulationsmechanismen vorliegen, um die Zellen synchron in den Status eines hohen endogenen Modifikationsgrades zu versetzen. Hinzu kommt, dass Modifikationen an den Seitenketten der Aminosäuren oft sehr instabil sind, was während der Proteinanreicherung zu Verlusten der Modifikationen führen kann (Seo und Lee, 2004). Trotz der aufgeführten Schwierigkeiten sind posttranslationale Modifikationen ein überaus interessantes und wichtiges Forschungsgebiet in der Zellbiologie, weil sie im Vergleich zur Proteinregulation über Transkription, Translation und Komplexassemblierung für die Zelle schneller, flexibler und energetisch günstiger einzusetzen sind.

1.1.3 Generierung der MHC-Klasse-I Epitope und ihrer Precursor durch das Proteasomensystem

Das Proteasomensystem spaltet zum Abbau markierte Proteine in Peptide. Mithilfe fluorogener Peptidsubstrate können den einzelnen katalytischen Untereinheiten des Proteasoms charakteristische proteolytische Aktivitäten zugeordnet werden. Diese Substrate bestehen aus Tri- oder Tetrapeptiden mit einer C-terminal gebundenen chemischen Gruppe, die bei Abspaltung fluorogen wird. Die Untereinheit $\beta 1$ spaltet bevorzugt fluorogene Substrate mit sauren Aminosäuren vor der fluorogenen Gruppe und zeigt damit eine Caspase-ähnliche Aktivität. Der Untereinheit $\beta 2$ wird eine Trypsin-ähnliche Aktivität zugeschrieben, da die sie C-terminal nach basischen Aminosäuren schneidet, und die $\beta 5$ -Aktivität wird auf Grund der Hydrolyse nach hydrophoben Aminosäuren als Chymotrypsin-ähnlich bezeichnet (Orlowski und Wilk, 2000).

Werden hingegen den *in vivo* Bedingungen eher entsprechende Peptidsubstrate mit mehr als 20 Aminosäuren durch das Proteasom degradiert, lässt sich diese strikte Zuteilung von Schnittpräferenzen auf einzelne katalytische β -Untereinheiten nicht mehr aufrecht erhalten (Kisselev et al., 1999; Kuckelkorn et al., 1995; Schmidtke et al., 1998). Des Weiteren entscheidet beim Abbau längerer Substrate nicht nur die C-terminale Aminosäure über die Schnitteffizienz, sondern auch Aminosäurereste innerhalb des Epitopes sowie in den flankierenden Sequenzen (Beekman et al., 2000; Eggers et al., 1995; Nussbaum et al., 1998; Peters et al., submitted). Als generelles Charakteristikum der proteasomalen Schnittpräferenz gilt jedoch, dass Proteasomen die Spaltung nach basischen und hydrophoben Aminosäuren favorisieren (Boes et al., 1994; Niedermann et al., 1995; Ossendorp et al., 1996). Der C-Terminus der an MHC-Klasse-I bindenden Epitope wird – mit einer bekannten Ausnahme – durch das Proteasomensystem generiert (Kloetzel, 2004; Seifert et al., 2003). Der N-Terminus hingegen ist weniger strikt durch das Proteasom definiert (Cascio et al., 2001). Dies wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass cytosolische Aminopeptidasen im Zuge der Proteindegradation Peptide vom N-Terminus aus verkürzen und vollständig in einzelne Aminosäuren zerlegen können. Die N-terminal elongierten MHC-Klasse-I Epitope, im Folgenden als „Precursor“ bezeichnet, vergrößern demnach die Wahrscheinlichkeit, dass die Epitope nicht im Cytosol degradiert werden (Reits et al., 2004).

In Zellkultur eingesetzt stimuliert $\text{IFN}\gamma$ die Expression von $\text{PA28}\alpha$ und $\text{PA28}\beta$ (Realini et al., 1994) sowie von drei alternativen proteolytischen β -Untereinheiten (Groettrup et al., 1996a; Ortiz-Navarrete et al., 1991). Sind diese alternativen β -Untereinheiten im Cytosol vorhanden, werden sie bevorzugt in neugebildete Proteasomen integriert und ersetzen ihre konstitutiven Homologe (Frentzel et al., 1994; Groettrup et al., 1997). Entsprechend ihrer Austauschpartner

werden sie als induzierbares $\beta 1$ ($i\beta 1$), $i\beta 2$ und $i\beta 5$ oder zusammen als Immuno-Untereinheiten bezeichnet und bilden mit den nicht-aktiven α - und β -Untereinheiten das Immunoproteasom (Aki et al., 1994; Akiyama et al., 1994). Untersuchungen der proteasomalen Aktivität mithilfe fluorogener Substrate in Abhängigkeit vom Vorhandensein der konstitutiven und der Immuno-Untereinheiten zeigen ein sehr uneinheitliches Bild. Während einige Ergebnisse für eine reduzierte Caspase-ähnliche Aktivität der Immunoproteasomen sprechen (Gaczynska et al., 1993; Kuckelkorn et al., 1995), ist in anderen Experimenten kein Unterschied zu erkennen (Driscoll et al., 1993; Ustrell et al., 1995). Die Trypsin-ähnliche Aktivität wird einerseits als unverändert (Boes et al., 1994; Kuckelkorn et al., 1995), andererseits als in Immunoproteasomen erhöht (Driscoll et al., 1993; Gaczynska et al., 1993; Gaczynska et al., 1994) beschrieben, wohingegen für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität sowohl ein Anstieg (Driscoll et al., 1993; Gaczynska et al., 1993; Gaczynska et al., 1994) als auch eine Reduktion (Boes et al., 1994; Eleuteri et al., 1997; Kuckelkorn et al., 1995) infolge der Inkorporation der Immuno-Untereinheiten gefunden wurde. Wie schon oben erwähnt, sind den aktiven β -Untereinheiten und ihren induzierbaren Homologen allgemeingültig offenbar keine spezifischen Aktivitäten zuzuordnen.

Physiologisch relevantere Prozessierungsexperimente mit Peptidsubstraten, die sich von viralen und zelleigenen Proteinen ableiten, zeigen, dass die Immuno-Untereinheiten einen positiven Effekt auf die Epitop- und Precursorgenerierung ausüben (Kloetzel, 2001; Sijts et al., 2001). Dies gilt für die Epitope und Precursor von körpereigenen Proteinen wie MAGE3 (Schultz et al., 2002), Hsp60 (Kuckelkorn et al., 2002), HY (Fehling et al., 1994) und Enolase-1 (Toes et al., 2001) ebenso wie für die immunrelevanten Fragmente aus viralen Proteinen wie dem HBV Core Protein (Sijts et al., 2000a), HCV NS3 (Seifert et al., 2004), EBV LMP-2 (Lautscham et al., 2003), adenoviralem E1B (Sijts et al., 2000b), Nukleoproteinen des Influenza A Virus (Van Kaer et al., 1994) und von LCMV (Schwarz et al., 2000) sowie dem Gag Protein von MuLV (van Hall et al., 2000). Neben dieser Vielzahl an Berichten über eine gesteigerte Epitopgenerierung gibt es zwei Epitope, deren Produktion nicht durch Immunoproteasomen beeinflusst wird (van Hall et al., 2000; Van Kaer et al., 1994). Bislang konnte eine Arbeitsgruppe nur für die körpereigenen Proteine RU1, Melan-A, gp100 und Tyrosinase zeigen, dass konstitutive Proteasomen Epitope freisetzen, die von Immunoproteasomen nicht gebildet werden (Morel et al., 2000; Van den Eynde und Morel, 2001).

Wie das Vorhandensein der Immuno-Untereinheiten führt auch die Induktion des PA28-Komplexes zu einer verbesserten Produktion vieler Epitope und Precursor (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996b; Sun et al., 2002; van Hall et al., 2000). Ein negativer Einfluss von PA28 wurde bisher nicht veröffentlicht, allerdings gibt es Beispiele für Epitope, deren Produktion nicht durch PA28 zu verstärken ist (Schwarz et al., 2000; van Hall et al., 2000).

Der positive Effekt von PA28 ist möglicherweise mit der Öffnung der α -Ringe und einem daraus folgenden schnelleren Substratdurchsatz zu begründen (Groll et al., 2000; Stohwasser et al., 2000). Zudem verursacht die Bindung von PA28 an 20S Proteasomen wahrscheinlich eine Konformationsänderung innerhalb des 20S Proteasoms, die in der verstärkten Nutzung bestimmter Schnittstellen resultiert (Dick et al., 1996; Li et al., 2001; Sun et al., 2002).

Aussagen über die Schnittpräferenzen des konstitutiven und des Immunoproteasoms entstehen durch Analyse von *in vitro* durchgeführten Prozessierungsexperimenten. Hierbei werden gereinigte 20S Proteasomen mit einem Peptidsubstrat inkubiert, die Prozessierungsprodukte über Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) getrennt und in der Massenspektrometrie identifiziert. Die so erlangten *in vitro* Resultate reflektieren überzeugend *in vivo* Beobachtungen, in denen die Epitopgenerierung aus nativen Proteinen durch das endogene Proteasomensystem mittels CTL-Experimenten analysiert wird (Eggers et al., 1995; Schultz et al., 2002; Schwarz et al., 2000; Sijts et al., 2000a; Sijts et al., 2000b; Sun et al., 2002). Der *in vitro* auf die 20S Proteasomen und das Peptidsubstrat minimierte Ansatz kann deshalb als Modell der komplexeren *in vivo* Prozessierung in der Zelle betrachtet und verwendet werden.

Die Stimulation von Zellen mit Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) führt zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche und ergibt einen Anstieg der Transkripte für die Immuno-Untereinheiten $\text{i}\beta 1$ und $\text{i}\beta 5$ (Loukissa et al., 2000; Raasi et al., 1999). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung verschiedener Zellen mit TNF α die Proteine des MHC-Klasse-I Präsentationsweges einschließlich der Immuno-Untereinheiten induziert und MHC-Klasse-I Moleküle stabilisiert werden. Die beobachtete Stimulation fiel geringer aus als ein mit IFN γ erzielter Effekt auf dieselben Proteine. Da die Ergebnisse nicht auf eine basale Wirkung von IFN γ zurückzuführen waren, legen sie die Vermutung nahe, dass TNF α in der Lage ist, einen Verlust von IFN γ auszugleichen, und als stellvertretendes Cytokin wirken kann (Hallermalm et al., 2001). Der direkte Einfluss von TNF α auf die proteasomale Generierung immunrelevanter Peptide wurde in diesen Publikationen allerdings nicht untersucht.

1.2 Präsentation von Epitopen auf MHC-Klasse-I Molekülen

Durch das Proteasomensystem generierte Peptide und Epitope können von dem Heterodimer TAP („Transporter associated with Antigen Processing“) ATP-abhängig aus dem Cytosol in das ER befördert werden. TAP favorisiert Peptide mit acht und mehr Aminosäuren sowie einer hydrophoben oder basischen Aminosäure am C-Terminus (Peters et al., 2003; Shepherd et al., 1993). N-terminal elongierte Epitope, im Weiteren Precursor genannt, können vor und nach dem Transport durch Aminopeptidasen auf Epitoplänge „getrimmt“ werden. Im Cytosol stehen dafür unter anderem die Bleomycinhydrolase, Leucinaminopeptidase, Puromycin-sensitive Aminopeptidase sowie Tripeptidylpeptidase-II (TPPII) und Thimet-Oligopeptidase zur Verfügung, während im ER beispielsweise die Enzyme ERAP1 und ERAP2 mit gleicher Funktion lokalisiert sind (Rock et al., 2004). TAP ist im ER-Lumen mit einem partiell gefalteten MHC-Klasse-I Molekül und Chaperonen assoziiert (Ortmann et al., 1997). Die Chaperone unterstützen die Bindung des Epitopes an das MHC-Klasse-I Molekül, was in dessen Stabilisierung und seinem Transport über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche resultiert. Dort kann die Interaktion des Epitop-MHC-Klasse-I Komplexes mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren der CTLs erfolgen (Abb. 3).

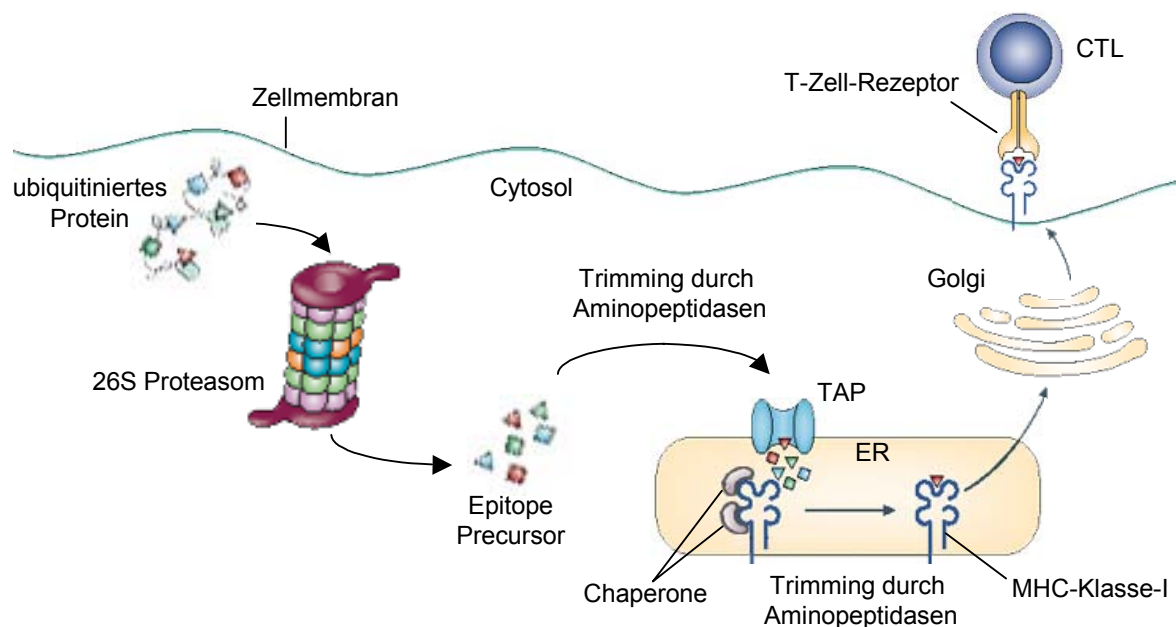


Abb. 3: Epitopgenerierung und MHC-Klasse-I Präsentation. Ubiquitinierte Proteine werden durch das 26S Proteasom zu Peptiden prozessiert, die durch cytosolische Aminopeptidasen getrimmt oder vollständig abgebaut werden können. TAP transportiert die Epitope und Precursor in das ER, wo nach eventuell weiterem Trimming die Epitope an MHC-Klasse-I Moleküle gebunden werden. Die beladenen MHC-Klasse-I Moleküle werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert, an der sie die Epitope den CTLs präsentieren. (Abbildung nach (Kloetzel, 2004; Pamer, 2004))

Das auf allen kernhaltigen Zellen vorhandene MHC-Klasse-I Molekül setzt sich aus dem β 2-Mikroglobulin und der transmembranen α -Kette zusammen. In der Maus existieren bis zu drei verschiedene MHC-Klasse-I Typen, die Histokompatibilität-2 (H-2) Moleküle, mit jeweils mehreren Allelen der α -Kette. Jede murine Zelle kann daher maximal sechs unterschiedliche MHC-Klasse-I Haplotypen exprimieren. Die Epitope besitzen eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren und interagieren über ihre terminalen Amino- und Carboxylgruppen mit der durch die α 1- und α 2-Domänen gebildeten Peptidbindungsfurche (**Abb. 4**). Zwei bis drei Aminosäuren des Epitopes sorgen als Ankerreste ebenfalls für eine Stabilisierung der Bindung. Die hochpolymorphen MHC-Klasse-I Haplotypen unterscheiden sich darin, welche Aminosäuren sie an welcher Position des Peptides hierfür bevorzugen. Da die restliche Peptidsequenz keinen weiteren Einfluss auf die Bindung ausübt, kann jeder Haplotyp eine Vielzahl von Epitopen präsentieren (Rammensee et al., 1995). Eine Gemeinsamkeit der meisten MHC-Klasse-I Haplotypen besteht darin, dass sie Epitope mit einer hydrophoben oder basischen Aminosäure am C-Terminus präferieren.

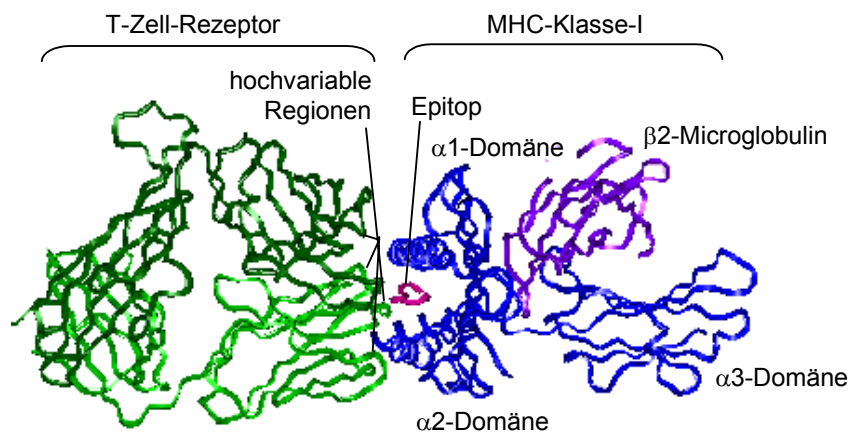


Abb. 4: Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein Peptid-beladenes MHC-Klasse-I Molekül. Es werden die extrazellulären Bereiche des T-Zell-Rezeptors (hell- und dunkelgrün) und des MHC-Klasse-I Moleküls (blau – α -Kette; violett – β 2-Mikroglobulin) mit Epitop (rosa) gezeigt. Im Text erwähnte Domänen sind beschriftet. Der dimere T-Zell-Rezeptor bindet mit den hochvariablen Regionen an das Epitop, welches in der Furche zwischen der α 1- und α 2-Domäne des MHC-Klasse-I Moleküls präsentiert wird. (Erweiterte Abbildung nach <http://allele5.biol.berkeley.edu>)

Die durch das Proteasomensystem gebildeten C-Termini entsprechen also den Bindungsrestriktionen der MHC-Klasse-I Moleküle und des TAP. Diese Tatsache unterstreicht die Verknüpfung von Proteasomen- und Immunsystem und ist als Hinweis auf die Anpassung des evolutionär jüngeren Immunsystems an das ältere Proteasomensystem zu werten. Doch auch das Proteasomensystem hat sich mit der Entstehung des Immunsystems in den Vertebraten weiterentwickelt: Die katalytisch aktiven Immuno-Untereinheiten und PA28 ebenso wie die Untereinheiten des MHC-Klasse-I Moleküls, die TAP-Proteine (Schroder et al., 2004) und einige Aminopeptidasen (Beninga et al., 1998; Saric et al., 2002; Tanioka et al.,

2003) sind durch das proinflammatorischen Cytokin IFN γ induzierbar und können die MHC-Klasse-I Präsentation der Epitope verstärken.

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei Ketten, die in der Erkennungsregion hochvariabel sind. Ähnlich den Antikörpern werden diese durch Rearrangements der chromosomalen DNA gebildet. Kann ein T-Zell-Rezeptor den Komplex aus Epitop und MHC-Klasse-I Molekül binden (**Abb. 4**), wird der CTL angeregt, die Zelle anzugreifen. Hierfür scheint die Interaktion eines einzigen T-Zell-Rezeptors mit einem Epitop-MHC-Klasse-I Komplex auszureichen (Stevanovic und Schild, 1999; Sykulev et al., 1996). CTLs, deren Rezeptoren Epitope aus körpereigenen Proteinen erkennen, werden nach ihrer Entstehung sofort weitgehend negativ selektioniert. Aus diesem Grund besteht das T-Zell-Repertoire eines Organismus vor allem aus solchen CTLs, die ausschließlich mit Komplexen aus MHC-Klasse-I Molekülen und Fremdepitopen interagieren.

1.3 Das murine Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes*

1.3.1 Verlauf der Listeriose

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) ist ein Gram positives, fakultativ anaerobes Stäbchen, das keine Sporen bildet und sich im Cytosol von Mammaliazellen vermehren kann. Werden Mäuse oral oder intravenös mit *L. monocytogenes* infiziert, gelangt ein Großteil der Bakterien sehr schnell in die Leber (Gregory et al., 1996; Huleatt et al., 2001; Kursar et al., 2002). Hier erzwingen sie sich über die Bindung von InternalinB an den Rezeptor des Hepatocyten-Wachstumsfaktors den Eintritt in die Hepatocyten (Rogers et al., 1996; Shen et al., 2000). Ein anderer Teil der Bakterien wird von den Makrophagen der Milz phagocytiert (Aichele et al., 2003). *L. monocytogenes* entkommt aus den Vesikeln und Phagosomen durch Sekretion von ListeriolysinO (LLO), einem die Membran zerstörenden Cytolysin (Bielecki et al., 1990). Im Cytosol der Wirtszelle erfolgt dann die Vermehrung, die von der sekretierten Mureinhydrolase p60 abhängig ist (Bubert et al., 1992). Indem *L. monocytogenes* durch Expression von ActA das zelleigene Aktin zur Polymerisierung anregt und sich so durch das Wirtscytosol bis in die Nachbarzelle schieben lässt, breitet sich der Erreger weiter aus (Kocks et al., 1992; Portnoy et al., 2002). Wie in **Abb. 5** gezeigt, beginnt dann erneut der parasitäre intrazelluläre Zyklus mit der Auflösung der Vesikel und dem Eintritt in das Cytosol der neuen Wirtszelle.

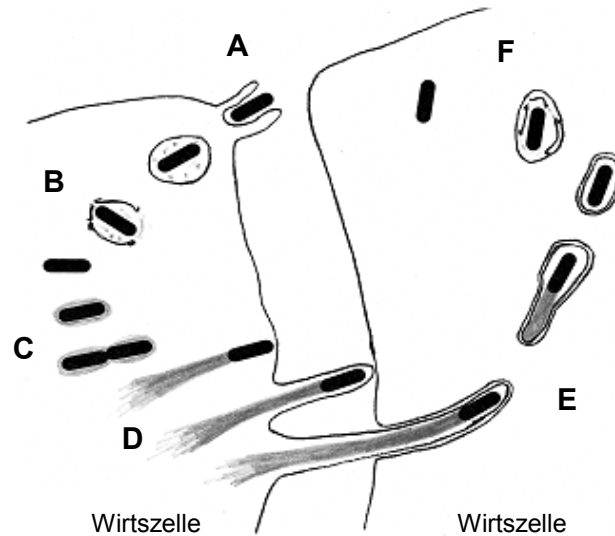


Abb. 5: Intrazellulärer Lebenszyklus von *Listeria monocytogenes*. (A) Internalin-vermittelte oder phagocytotische Aufnahme in die Zelle; (B) Lyse der Vesikelmembran durch LLO; (C) Vermehrung im Cytosol; (D) Fortbewegung mittels Aktinschweif; (E) Befall der Nachbarzelle; (F) Lyse der Vesikelmembranen. (Abbildung nach (Tilney und Portnoy, 1989))

Wenige Minuten nach der Primärinfektion eines Organismus wird die unspezifische Immunantwort aktiviert mit dem Ziel, die Verbreitung von *L. monocytogenes* einzudämmen. Nach einigen erfolgreichen Replikationszyklen der Pathogene treten die infizierten Hepatocyten in die Apoptose. Die dabei freigesetzten Signalstoffe rekrutieren phagocytierende Zellen zum Infektionsherd (Rogers et al., 1996). Parallel dazu werden natürliche Killerzellen durch $\text{TNF}\alpha$ und Interleukin-12 zur Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ angeregt. Die Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ aktiviert die eingewanderten Monocyten und Granulocyten, welche nun mit reaktivem Sauerstoff und Stickstoffmonoxid die Bakterien abtöten (Edelson und Unanue, 2000). Als Folge der Zelleinwanderung entstehen in der Leber und Milz um die infizierten Bereiche Granuloma, welche die angrenzenden Zellen vor der weiteren Verbreitung von *L. monocytogenes* schützen (Vazquez-Boland et al., 2001).

Während die unspezifische Immunantwort sehr schnell reagiert, dauert es bei einer Primärinfektion mehrere Tage, bis die spezifische oder adaptive Immunantwort ihre Wirkung entfalten kann. Ihre Aufgabe ist es, die restlichen infizierten Zellen zu entdecken und zu eliminieren, so dass der sterile Zustand in den Geweben wieder hergestellt wird. Die wichtigste Komponente der adaptiven Immunantwort gegen *L. monocytogenes* sind die CTLs (Ladel et al., 1994; McGregor et al., 1970). Die adaptive Immunantwort bildet auch die Grundlage für die protektive Immunität. Dies bedeutet, dass bei einer Sekundärinfektion die auf den Erreger schon abgestimmte adaptive Immunantwort ohne Verzögerung einsetzt und somit eine Erkrankung verhindert wird. Bei der Etablierung der CTL-basierten protektiven Immunität werden für einen kurzen Zeitraum T-Helferzellen Typ I gebraucht (Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003), die nur im Zusammenhang mit $\text{IFN}\gamma$ eine eigene

protektive Immunität bieten können (Harty et al., 1992; Ladel et al., 1994).

IFN γ und TNF α sind mit ihren pleiotropen Effekten für die Bekämpfung der Listeriose unbedingt notwendig (Harty und Bevan, 1995; Huang et al., 1993; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993). Beide Cytokine werden von Zellen der unspezifischen sowie der adaptiven Immunantwort sezerniert und wirken auf sämtliche kernhaltigen Zellen. TNF α wird als Homotrimer und Homodimer gebildet, kann sowohl membrangebunden als auch gelöst vorliegen und bindet an die Rezeptoren p55 und p75. Der Effekt von TNF α beruht auf der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B. Dieser induziert die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Cytokine, besonders von IFN γ , und die Expression der costimulatorischen Moleküle, welche für die Einleitung der adaptiven Immunantwort wichtig sind. Wenn NF κ B inhibiert ist, induziert TNF α jedoch die Apoptose der Zelle (Varfolomeev und Ashkenazi, 2004). IFN γ ist ein lösliches Homodimer, dessen Interaktion mit seinem heterodimeren Rezeptor in der Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges resultiert. Dies führt zur Expression von Genen, deren Produkte an der Aktivierung der T-Zellen und der spezifischen Erkennung infizierter Zellen beteiligt sind (1.1.3 und 1.2). In Makrophagen werden außerdem die antimikrobiellen Enzyme für die Produktion der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmonoxid-Moleküle induziert (Schroder et al., 2004). TNF α und IFN γ werden über Mechanismen reguliert, welche die für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene nötigen cytotoxischen Effekte begrenzen und somit weitere Zell- oder Gewebeschäden minimieren. Zu den Mechanismen zählen die negative Rückkopplung über die Induktion eines Inhibitors des Signalweges sowie die Reduktion des IFN γ -Rezeptors auf der Zelloberfläche und eine Destabilisierung der mRNA für IFN γ , wodurch die Cytokinproduktion vermindert wird. Die Bedeutung von TNF α und IFN γ für die Immunabwehr wird offensichtlich, wenn Mäuse, denen die Gene für die Rezeptoren dieser Cytokine fehlen, mit *L. monocytogenes* infiziert werden: Im Gegensatz zu Wildtypmäusen überleben sie die Listeriose nicht (Huang et al., 1993; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993).

1.3.2 Die MHC-Klasse-I Epitope von *Listeria monocytogenes*

Die Bekämpfung der *L. monocytogenes* Infektion ist dann erfolgreich gewesen, wenn sämtliche infizierten Zellen eliminiert und die Gewebe, wie z.B. die Leber, wieder steril sind. Es wurde nachgewiesen, dass *L. monocytogenes* in Mäusen die Hepatocyten infiziert (Rogers et al., 1996), und dass in Zellkultur infizierte Hepatocyten durch CTLs lysiert werden (Jiang et al., 1997). Ferner können CTLs in das Leberparenchym einwandern und dort die Hepatocyten angreifen (Ando et al., 1994; Knolle und Gerken, 2000). Dies deutet darauf hin, dass in *L. monocytogenes* infizierten Mäusen die CTLs die Leber infiltrieren und dort gegen die

Hepatocyten aktiv werden können. Eine Voraussetzung für die Lyse der infizierten Zellen ist, dass diese von den spezifischen CTLs erkannt werden, was wiederum die Präsentation von *L. monocytogenes* Epitopen auf MHC-Klasse-I Molekülen erfordert. Durch Elution der Epitope von MHC-Klasse-I Molekülen wurden insgesamt vier listerielle Epitope identifiziert, die aus der Mureinhydrolase p60, dem Cytolysin LLO und der Metalloprotease mpl stammen (Busch et al., 1999). Diese Proteine werden von *L. monocytogenes* in das Wirtscytosol sekretiert und sind infolgedessen dem Proteasomensystem zugänglich. Für eine Proteasomen-abhängige Degradation der bakteriellen Proteine spricht, dass die Sekretion in das Cytosol essentiell für eine protektive, CTL-basierte Immunantwort ist (Shen et al., 1998) und die Inhibierung der Proteasomen eine Abnahme der präsentierten p60-Epitope bewirkt (Sijts et al., 1996). Darüber hinaus werden p60 und ActA in Abhängigkeit von der N-Terminus-Regel degradiert (Moors et al., 1999; Sijts et al., 1997). LLO enthält eine PEST-Sequenz, die ebenfalls als Hinweis auf Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau gilt (Decatur und Portnoy, 2000; Rechsteiner und Rogers, 1996). Bis jetzt allerdings existiert kein direkter Nachweis für die Epitopgenerierung aus bakteriellen Proteinen durch das Proteasomensystem.

Die bislang untersuchten MHC-Klasse-I Epitope binden ausschließlich den MHC-Klasse-I Haplotyp H-2K^d (Busch et al., 1999). Eine neue Methode zur Epitopidentifizierung basiert auf dem Screening einer Peptidbibliothek, die sich aus überlappenden Dodecameren zusammensetzt. T-Zellen einer infizierten Maus werden mit dieser Peptidbibliothek inkubiert und die Erkennung eines Peptides durch Freisetzung von IFN γ gemessen. Angewandt auf p60- und LLO-Peptidbibliotheken konnten weitere Epitope identifiziert werden, unter anderem ein LLO-Epitop, welches an MHC-Klasse-I Moleküle vom Typ H-2K^b bindet (Geginat et al., 2001). Dieser Haplotyp wird auch von den Mausstämmen exprimiert, in denen die Gene für die TNF α - und IFN γ -Rezeptoren deletiert sind. Somit eignet sich das H-2K^b Epitop aus LLO, um die Immunreaktion auf *L. monocytogenes* in den beiden Deletionsstämmen zu untersuchen.

1.4 Massenspektrometrische Analyse der *in vitro* Prozessierungsexperimente

Bei der *in vitro* Prozessierung von Peptidsubstraten durch 20S Proteasomen entstehen komplexe Produktgemische. Die HPLC führt zu einer Auftrennung des Gemisches, dessen Peptide in einem direkt angeschlossenen Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert werden können. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf 1. der Ionisierung von Molekülen, 2. der Auftrennung der Ionen entsprechend ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z), 3. ihrer anschließenden Detektion und 4. ihrer Identifizierung durch ihre typischen molekularen Massen.

Für die Analyse der Prozessierungsexperimente eignet sich die Elektrospray-Ionisierung (ESI), da hierbei die Probe in gelöster Form eingesetzt wird. Das Eluat der HPLC wird in ein elektrisches Feld gesprüht, in dem sich die positiv geladenen Probentropfchen zur gegenüberliegenden Kathode bewegen. Die Verdampfung des Lösungsmittels erhöht in den Tröpfchen die Ladungsdichte und führt durch Coulomb-Explosion zum Zerfall in immer kleinere Tröpfchen und letztendlich zu einzelnen, desolvatisierten und positiv geladenen Molekülen. Diese werden über ein elektromagnetisches Fokussierungssystem in den Massenanalysator, die Ionenfalle, geleitet, wo sie für wenige Millisekunden akkumulieren. Durch Spannungsänderungen an den Elektroden werden die ionisierten Moleküle nach ansteigendem m/z aus der Ionenfalle entlassen. Die Detektion erfolgt mit einem Sekundärelektronenvervielfacher, der kleine Ionenströme durch Umwandlung in eine Elektronenkaskade nachweist. Eine Darstellungsform der Messergebnisse ist das dreidimensionale Chromatogramm, in welchem auf der x-Achse die Retentionszeiten aus der HPLC, auf der y-Achse die gemessenen Ionenströme und auf der z-Achse die m/z angegeben werden. Der Aufbau der HPLC-ESI-Ionenfalle ist in **Abb. 6** gezeigt (Lottspeich und Zorbas, 1998; Schrattenholz, 2001).

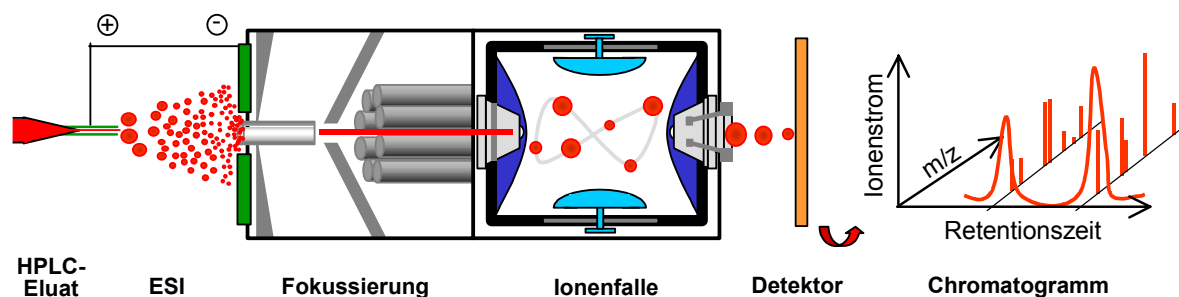


Abb. 6: Schematische Darstellung der HPLC-ESI-Ionenfalle und eines Chromatogramms. Durch eine Kapillare werden die Moleküle des HPLC-Eluats (rot) zwischen die Elektroden der ESI-Einheit (grün) gesprüht, deren Anode von der Kapillare gebildet wird. Hierbei erfolgt die Ionisierung der Moleküle. Nach der Fokussierung werden die ionisierten Moleküle in der Ionenfalle durch die Ringelektrode (hellblau) auf kreisförmige Bahnen gezwungen. Durch Zuschalten der Endkappenelektroden (dunkelblau) und daraus folgender Spannungsänderungen werden die Moleküle aus der Ionenfalle geworfen. Die Retentionszeit, der Ionenstrom und das m/z der detektierten Moleküle werden im Chromatogramm dargestellt. (Abbildung nach Dr. Katharina Janek)

Die Quantifizierung der Peptide erfolgt im Chromatogramm über die Integration der Fläche unterhalb des für ein Peptid spezifischen m/z -Peaks. Je mehr Peptid detektiert wird, desto größer ist die Fläche des Peaks. Die Peakfläche ist also ein Maß für die Peptidmenge und wird als Intensität ohne Einheiten angegeben. Da verschiedene Moleküle unterschiedlich gut ionisierbar und folglich auch unterschiedlich gut detektierbar sind (Cech und Enke, 2001), können nur relative Intensitäten miteinander verglichen werden: Die Intensitätszunahme eines Produktes kann der Intensitätsabnahme eines weiteren Produktes gegenübergestellt werden; die Aussage, dass das eine Peptid mengenmäßig häufiger vorhanden ist als das andere, ist

allerdings nicht möglich.

Im Prozess der Ionisierung können mehrere Ladungen auf ein Molekül übergehen. Ein Ion mit zweifacher Ladung bewegt sich im elektrischen Feld doppelt so schnell wie das gleiche, einfach geladene Molekül. Aus diesem Grund ist jenes zweifach geladene Molekül nicht von einem anderen Teilchen zu unterscheiden, das zwar doppelt so groß aber nur einfach geladen ist: Beide Moleküle werden gleichzeitig aus der Ionenfalle geworfen. Dies bedeutet, dass in der Massenspektrometrie nicht direkt die molekulare Masse sondern das schon erwähnte Masse/Ladungs-Verhältnis, m/z , detektiert wird. Um die Masse und damit die Identität eines Moleküls zu ermitteln, muss daher seine Ladungsstufe bekannt sein, die aus isotonen aufgelösten Massenspektren („Zoom Scans“) abgelesen wird. Je nach Aminosäuresequenz können verschiedene Peptide die gleichen molekularen Massen besitzen. Um trotzdem eine exakte Identifizierung zu gewährleisten, ist die zusätzliche Information über die Aminosäuresequenz erforderlich. Diese Möglichkeit bietet die Ionenfalle, da – im Gegensatz zu anderen Masseanalysatoren, wie z.B. dem einfachen TOF („Time of Flight“) – die fraglichen Moleküle im MS/MS-Experiment gezielt sequenziert werden können. Wurde ein Produkt der Prozessierungsexperimente einmal auf diese Weise in einem Sequenzierungslauf identifiziert, reicht die Kenntnis seines m/z sowie der definierten Retentionszeit aus, um es in den sich anschließenden Quantifizierungsläufen ebenfalls zu identifizieren.

1.5 Zielstellung

Das Proteasom degradiert defekte und nicht benötigte Proteine im Cytosol der Zelle. Ein Teil der dabei entstehenden Peptide fungiert als MHC-Klasse-I Epitope und stellt so eine Verbindung des Proteasomensystems mit der Immunabwehr her. Der Einfluss der proinflammatorischen Cytokine IFN γ und TNF α auf die Struktur und Funktion der Proteasomen wurde bislang nur in der Zellkultur analysiert. Diese stellt ein überschaubares System dar, welches aber von der komplexen Situation im Organismus sehr verschieden ist. Die vorliegende Arbeit sollte diese Lücke schließen. Hierfür wurde das immunphysiologisch gut charakterisierte murine Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* gewählt in Kombination mit der Infektion von Mausstämmen, deren Gene für die Rezeptoren von IFN γ und TNF α deletiert wurden. Folgende Aspekte sollten bearbeitet werden:

- Analyse der 20S Proteasomen aus verschiedenen Geweben zu einzelnen Zeitpunkten nach der Infektion bezüglich der Immuno-Untereinheiten
- Etablierung von Methoden zum Nachweis der posttranslationalen Modifikation mit O-GlcNAc und deren Anwendung auf die nach der Infektion isolierten 20S Proteasomen
- Funktionelle Charakterisierung der 20S Proteasomen durch *in vitro* Prozessierung von Peptidsubstraten
- Optimierung der massenspektrometrischen Auswertung zur detaillierten Analyse des proteasomalen Schnittverhaltens

Die vorliegende Arbeit sollte die Beziehung zwischen Struktur und Funktion der isolierten 20S Proteasomen in Abhängigkeit von den Cytokinen IFN γ und TNF α aufzeigen und dies erstmalig auf der Basis eines infizierten Organismus untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

AAF-CMK	Sigma
Acetonitril (für HPLC)	Baker
Acrylamid 30%, 29:1	AppliChem
Agarose	Serva
Ammoniumchlorid	Serva
Ammoniumsulfat	AppliChem
Ampholine TM	Amersham
Ampicillin	AppliChem
Amplify	Amersham
Aprotinin	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bacto-Agar	AppliChem
Bacto-Trypton	AppliChem
Bestatin	Sigma
beta-Mercaptoethanol	Serva
bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Serva
Bromphenolblau	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Coumarinsäure	Sigma
DEAE Sephacel	Amersham
DEPC	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
DMEM-Glc ⁻ -Medium	Biochrom
DMF	Sigma
DMSO	Fluka
DTT	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	AppliChem
fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
fluorogene Peptidsubstrate	Bachem Biochemica, Calbiochem
Formaldehyd	Baker
D-1[- ¹⁴ C]Glucosamin	Amersham

Glycerol	Roth
H ₂ O (für HPLC)	Baker
Hefeextrakt	Difco
HEPES	Roth
Isopropanol	Baker
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Kalziumchlorid	Sigma
Kanamycin	Serva
L-Glutamin	Biochrom
Leupeptin	AppliChem
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Fluka
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	AppliChem
Magermilchpulver	Difco
Manganchlorid	Fluka
Methanol	Baker
³⁵ S-Methionin	ICN
MG132	Calbiochem
Molekulargewichtstandard: Protein prestained blue	Biolabs
Molekulargewichtstandard: Protein Rainbow	Amersham
Na-Doc (Desoxycholatsäure Natriumsalz)	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Sigma
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumfluorid	Roth
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumthiosulfat	Sigma
Nonidet P40 (NP40)	AppliChem
Okadainsäure	Sigma
Orthovanadat	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Seromed
PepstatinA	Sigma
Peptidsubstrate	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie
PIC Complete (Proteinasen-Inhibitoren-Cocktail)	Roche
Pharmalyte™	Amersham

PMSF	Sigma
ProteinA-Sepharose	Amersham
RPMI-Medium	Biochrom
RMPI-Met ⁻ -Medium	Biochrom
Saccharose	Roth
SDS	AppliChem
Servalyte®	Serva
Silbernitrat	Roth
TEMED	Serva
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka
Tris	AppliChem
Trypanblau-Stammlösung	Sigma
Tween20	Serva
WGA-Lectin, Peroxidase-gekoppelt	Sigma
Wasserstoffperoxid	Roth
Xylencyanol	Serva

2.1.2 Antikörper

anti-Delta (K43/7)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-LMP2 (K864/A)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-LMP7 (K63/5)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-MC14 (K53)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-MB1 (FB774)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-Mec11 (K65/4)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-20S (K08)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
anti-ClpC	Prof. P. Berche
anti-F4/80	Arbeitsgruppe PD Dr. U. Steinhoff, MPIIB
anti-O-GlcNAc (CTD110.6)	Covance
anti-O-GlcNAc (MA1-076)	Affinity Bioreagents
anti-KaninchenIgG, Peroxidase-gekoppelt (GAR)	Dianova
anti-MausIg, Peroxidase-gekoppelt (RAM)	Dako

2.1.3 Nukleinsäuren

dNTPs	Invitrogen
DNA-Längenstandard: 1 kb DNA-Marker	GibcoBRL

DNA-Längenstandard: 100 bp DNA-Marker	Fermentas
Vektor: pCR®2.1-TOPO	Invitrogen
Vektor: pCMV-Tag 3C	Stratagene
Oligo-dT-Pimer	BioTeZ Berlin-Buch GmbH
Primer (Tab. 1)	BioTeZ Berlin-Buch GmbH
siRNAs (Tab. 2)	eurogentec

Für die Klonierungen wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 α (Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.-M. Kloetzel) verwendet.

Tab. 1: Verwendete spezifische Primer. Alle Primer wurden nach Reinigung durch Gelfiltration geliefert. Die Konzentration der Arbeitslösungen betrug 10 μ M.

Name	Sequenz
NAG1_fwd	5'-GGATCCATGGTGCAGAAGGAGAGCCAGG-3'
NAG2_rev	5'-CCAGGTAGAAGCTTCTCACCC-3'
NAG2_fwd	5'-GGGTGAGAAGCTTCTACCTGG-3'
NAG3_rev	5'-GGTGAACATCCCCATCACTAGTGC-3'
NAG3_fwd	5'-GCACTAGTGATGGGGATGTTACCC-3'
NAG4_rev	5'-GTCGACTCACAGGCTTCGACCAAGTATAACC-3'
816-385-G2	5'-CACATGCACAAGTTTCCATC-3'
OGT1_fwd	5'-GGATCCATGGCGTCTTCCGTGGGCAACG-3'
OGT2_rev	5'-GGATGGCACGAGTATAAACTGC-3'
OGT2_fwd	5'-GCAGTGTTATACTCGTGCCATCC-3'
OGT3_rev	5'-CCATGAACAGTGCACCACTAGTCC-3'
OGT3_fwd	5'-GGACTAGTGGTGCAGTGTTCATGG-3'
OGT4_rev	5'-GTCGACTCAGGCTGACTCGGTGACTTCAACAGGC-3'

Tab. 2: Verwendete siRNAs. Die siRNAs waren HPLC-gereinigt und wurden in DEPC-H₂O zu einer Konzentration von 100 μ M aufgenommen.

Name	Sequenz
siNAG_1_s	5'-ACGCAAAUUGGACCAGGUCdTdT-3'
siNAG_1_as	5'-GACCUGGUCCAAUUUGCGU dTdT-3'
siOGT_2_s	5'-TGGCATCGATCTCAAAGCAdTdT-3'
siOGT_2_as	5'-TGCTTTGAGATCGATGCCAdTdT-3'
siKontrolle_s	5'-GCAGAAUCCGUAUCGCAAGdTdT-3'
siKontrolle_as	5'-CUUGCGAUACGGAUUCUGC dTdT-3'

2.1.4 Enzyme

DNA Polymerase: High Fidelity	Roche
DNA Polymerase: Pfu	Promega
DNA Polymerase: Taq	Invitrogen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Reverse Transkriptase M-LV	Promega
RNAasin	Promega
Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche
T4 Ligase	New England Biolabs

2.1.5 Kits

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits	Amersham
HighPure RNA Isolation Kit	Roche
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
TOPO TA Cloning TM Kit	Invitrogen

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Centricon® Plus-20	Millipore
Combitips	Eppendorf
Einmalspritzen	Braun
Elektroporations-Küvetten	EquiBio
Kryoröhrchen	Nunc
Mikrotiter-Platten, schwarz	Greiner
Petrischalen	Greiner
PhastGel 4-15; native Pufferstreifen	Amersham
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore
Röntgenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Sterilfilter 4,5; 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell
Zellkultur-Plastikwaren, steril	Falcon, Greiner

2.1.7 Geräte

ÄktaFPLC	Amersham
----------	----------

Dounce-Homogenator	Kontes Glass
Easyject Optima Elektroporator	EquiBio
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software	SLT / Tecan
Gradientenmischer	Werkstatt, Institut für Biochemie
Gradientenzapfanlage	Werkstatt, Institut für Biochemie
HPLC HP1100	Hewlett Packard
HPLC System Gold, Detektor 166	Beckman Coulter
HPLC-Säule Micra NPS ODS-I 1,5 ktm Säule	Bischoff chromatography
HPLC-Säule μ RPC C2/C18 SC 2.1/10	Amersham
Kühlzentrifuge: Avanti J-25	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge: GS-6R	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge: GS-15R	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge: RC24	Sorvall
Massenspektrometer, TSQ7000	Finnigan Mat
Massenspektrometer MALDI	Applied Biosystems
Mastercycler gradient	Eppendorf
Mikroskop Leitz DMRD	Leica
MonoQ-Säule 5/5	Amersham
Phastsystem®	Pharmacia
Photometer: GeneQuant	Pharmacia
Photometer: UltrospecIII	Pharmacia
Rotor SS34	Sorvall
Rotor SW40	Beckman Coulter
Steril gard Hood classII A1 B3	Baker
Ultra-Turrax® T8	IKA®-Werke
Ultrasenzentrifuge: L-70	Beckman Coulter
Ultrasenzentrifuge: Ultra Pro 80	Sorvall
2D-Gelsystem	LabTech

2.1.8 Software

AIDA	Fuji
Extraktor-B5	Dr. Björn Peters
LCquan	ThermoFinnigan
OligonucleotidePropertiesCalculator	www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html
SEQUEST 2.0	ThermoFinnigan
Visual Basics	Microsoft
Xcalibur	ThermoFinnigan
YinOYang	www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang

2.2 Methoden

2.2.1 Mäuse

2.2.1.1 Mausstämme und *Listeria monocytogenes* Infektion

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Mäuse des H-2^b Haplotyps verwendet. Es handelte sich um den Laborstamm C57Black/6 (Wildtypmäuse) sowie die vor diesem genetischen Hintergrund generierten Stämme mit Deletion des IFN γ -Rezeptor (I-Tiere), beziehungsweise mit Deletionen von p55 und p75, den Rezeptoren für TNF α (T-Tiere). Die Tierhaltung erfolgte im Tierstall des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie (MPIIB), und die Mäuse wurden freundlicherweise von PD Dr. Ulrich Steinhoff, MPIIB, mit 5×10^3 cfu *Listeria monocytogenes* intravenös in die Schwanzvene infiziert. Die Wildtypmäuse erholten sich vollständig von der Listeriose, während die I-Tiere am 4./5. Tag post Infektion (p.i.) und die T-Tiere am 3. Tag p.i. der Listeriose erlagen. Somit wurden Tötung und Organentnahme bei den Wildtypmäusen am Tag 0, 2, 6 und 27 p.i., bei den I-Tieren am Tag 0, 2 sowie 4 p.i. und bei den T-Tieren am Tag 0 und 2 nach der Infektion durchgeführt. Dünndarm und Colon wurden mit 1x PBS gespült, während Milz und Leber nicht weiter behandelt wurden. Die Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Die Infektion wurde dreimal wiederholt.

- 10x PBS: 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 81 mM Na₂HPO₄; 15 mM KH₂PO₄; (pH 7,2 mit HCl einstellen)

2.2.1.2 Bestimmung der Bakterientiter in Organen

Die Bakterientiter in den Organen wurden im Rahmen eines gemeinsamen Projektes von Thorsten Joeris, MPIIB, bestimmt. Hierfür wurden die Organe in RMPI-Medium mit dem Ultra-Turrax® zerkleinert, 10fach in PBS verdünnt und auf Tryptic-Soy-Agar ausgestrichen. Die Colon- und Dünndarm-Homogenate wurden auf Palcam-Listeria-Selektiv-Agar (VWR International) ausplattiert, damit gegen die intestinale Mikroflora selektioniert werden konnte. Nach 16 h bei 37°C wurden am nächsten Tag die gewachsenen Kolonien gezählt.

2.2.1.3 Herstellung der Organhomogenate für die Präparation von 20S Proteasomen

Für die Präparation von 20S Proteasomen (2.2.2.1) aus den verschiedenen Organen wurden die Gewebe von bis zu fünf Tieren im halb-gefrorenen Zustand in 10-30 ml gekühlten Lysepuffer gegeben und mit dem Ultra-Turrax® auf Eis zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebezellen in einem Douncer durch 20maliges Stampfen aufgeschlossen und das Homogenat bei 45000 xg, 30 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Mullbinden gefiltert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei der Lyse der Organe aus dem dritten Infektionsansatz wurden zusätzlich Phosphataseinhibitoren eingesetzt.

- Lysepuffer: 1x TEAD; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,1 % (w/v) NP40; 1x PIC Complete; 1 µM PepstatinA; 2 µg/ml Bestatin
- Lysepuffer mit Phosphataseinhibitoren: Lysepuffer; 50 mM NaF; 200 µM Orthovanadat; 7,5 nM Okadainsäure
- Dünndarm-Lysepuffer: Lysepuffer, 2x PIC Complete; 1 mM PMSF
- 10x TEAD: 200 mM Tris/HCl pH 7,8; 10 mM EDTA; 10 mM NaN₃; 10 mM DTT

2.2.1.4 Herstellung der Organhomogenate für Cytokinbestimmung

Nach dem Austesten verschiedener Lysetechniken und Lysepuffer wurde für die Cytokinbestimmung (2.2.4.4) folgende Methode angewandt: Frische Organe wurden im Cytokin-Lysepuffer mit dem Ultra-Turrax® homogenisiert und bei 45000 xg, 30 min mehrfach zentrifugiert. Das Homogenat wurde für die Cytokinbestimmung verwendet.

- Cytokin-Lysepuffer: 1x PBS; 1 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Tween20; 0,1 % (w/v) CHAPS; 1x PIC Complete; 1 mM Pefabloc®; 1 mM PMSF

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Präparation von 20S Proteasomen

Die zügig aufgetauten Gewebekomogenate (2.2.1.3) oder frischen Zell-Lysate (2.2.6.3) wurden mit äquilibriertem DEAE Sephacel bei 4°C auf einem Rad inkubiert. Nach 1 h wurde das DEAE Sephacel in eine Säule überführt und mit 70-150 ml eiskaltem TEAD-50 gewaschen, bis der Proteingehalt des Durchlaufs bei der A₂₈₀-Messung einen Wert unter 0,08 aufwies (siehe auch 2.2.2.2). Der Waschschrift wurde mit eiskaltem TEAD-150 wiederholt und die gebundenen Proteine durch gekühltes TEAD-350 in zwanzig 2 ml Fraktionen auf Eis eluiert. Die proteolytisch aktiven Fraktionen (2.2.2.13) wurden vereinigt und einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Um zu einer 35%igen Sättigung zu gelangen, wurden pro 10 ml DEAE-Pool 1,94 g Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren auf Eis hinzugegeben. Nach weiteren 30 min Rühren wurde der Ansatz bei 25000 xg, 10 min, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2,91 g pro 10 ml auf 80% Sättigung gebracht, 30 min auf Eis gerührt und dann bei 19000 xg, 4°C, 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl TEAD-50 auf Eis langsam gelöst, noch einmal bei 19000 xg, 10 min, 4°C geklärt und anschließend auf einen 10-40%ige Saccharosegradienten geladen. Die Zentrifugation erfolgte bei 2,8x10⁵ xg, 4°C, 16 h. Das Fraktionieren der Gradienten von unten wurde durch eine Gradientenzapfanlage ermöglicht. Die erhaltenen Fraktionen wurden entsprechend ihrer Aktivitäten gepoolt, 1:10 mit PufferA verdünnt, filtriert und dann in der ÄktaFPLC mit 1 ml/min auf eine MonoQ-Säule geladen. Der Stufengradient verlief von 0% zu 20% PufferB in 3 ml, darauf folgte die flachere Elutionsstufe zu 35% PufferB in 20 ml und zum Schluss ein Reinigungsschrift auf 100% PufferB in 3 ml. Die 1 ml Fraktionen wurden unter dem Aspekt der proteolytischen Aktivität und des Proteingehaltes nach A₂₈₀ Messung (2.2.2.2) vereinigt.

Es folgte ein Umpuffern und Konzentrieren in TEAD-50 mittels der Centricons® Plus-20 laut Herstellerangaben.

- Lysepuffer: siehe 2.2.1.3
- 10x TEAD: siehe 2.2.1.3
- TEAD-50: 1x TEAD; 50 mM NaCl
- TEAD-150: 1x TEAD; 150 mM NaCl
- TEAD-350: 1x TEAD; 350 mM NaCl
- 1x TEA: 20 mM Tris/HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 1 mM NaN₃
- Aktivitätstestansatz: 1x TEA; 20 µM Z-GLL-AMC
- Saccharosegradienten: 10-40% (w/v) Saccharose in 1x TEA
- PufferA: 1x TEAD; 100 mM NaCl; (filtriert)
- PufferB: 1x TEAD; 1 M NaCl; (filtriert)

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt (A_{280}). In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentration von isolierten Proteasomen oder die Gesamtproteinkonzentration in Homogenaten bestimmt. Für $A_{280} = 1$ wurde eine Konzentration von 1 µg/µl angenommen und der spezifische Extinktionskoeffizient vernachlässigt. Somit konnten zwar keine korrekten absoluten Konzentrationsangaben gemacht werden, aber die Verhältnisse der eingesetzten Proteasomen- oder Proteinmengen waren identisch.

2.2.2.3 Proteinfällung

Zur Proteinfällung wurde die Proteinlösung mit dem 2,5fachen Volumen an 100% EtOH versetzt, gemischt und mindestens 1 h bei -80°C inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 19000 xg, 4°C, 30 min an sowie das Waschen des Pellets mit 70% EtOH. Die luftgetrockneten Pellets wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Aktivitätstest im Gel

In der native Gelelektrophorese wurden 0,7 µg Proteasom eingesetzt. Die Trennung erfolgte im Phast-System mit einem 4-15% Gradientengel bei 15°C und 110 Vh. Das Gel wurde mit Overlay-Puffer bedeckt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivität der Proteasomen und eventuell kontaminierender kleinerer Proteasen konnte nach Anregung mit UV-Licht detektiert werden.

- Overlay-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,5; 100 µM Bz-Val-Gly-Arg-AMC

2.2.2.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Für die Auftrennung in der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer

versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, 1 min bei 19000 xg zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 80 V für 20 min begonnen und dann mit 130 V für 1-2 h weitergeführt, entsprechend der Acrylamidkonzentrationen im Trenngel.

- 4x SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris/HCl pH 7; 40% (w/v) Glycerol; 16,7% (v/v) beta-Mercaptoethanol; 9% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau
- Sammelgel 5%: 167 mM Tris/HCl pH 8,8; 5% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,07% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
- Trenngel 10%: 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 10% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,07% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
- Trenngel 15%: 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 15% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,07% (w/v) APS; 0,075% (v/v) TEMED
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

2.2.2.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schagger/vonJagow

Für die Auftrennung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schagger/vonJagow (Schagger und von Jagow, 1987) wurden die Proben mit 4x Schagger-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, 1 min bei 19000 xg zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 30 V für 60 min begonnen und dann mit 85 V für 16 h weitergeführt.

- 4x Schagger-Probenpuffer: 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 48% (w/v) Glycerol; 8% (v/v) beta-Mercaptoethanol; 16% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau
- Gelpuffer: 3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3% (w/v) SDS
- Schagger-Acrylamidstammlösung: 48% (w/v) Acrylamid; 1,5% (w/v) Bisacrylamid
- Sammelgel: 18,5% (v/v) Gelpuffer; 6% (v/v) Schagger-Acrylamidstammlösung; 8% (w/v) Glycerol; 0,06% (w/v) APS; 0,06% (v/v) TEMED
- Trenngel: 20% (v/v) Gelpuffer; 20% (v/v) Schagger-Acrylamidstammlösung; 0,03% (w/v) APS; 0,03% (v/v) TEMED
- Anodenpuffer(+): 0,2 M Tris/HCl pH 8,9
- Kathodenpuffer(-): 0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1% (w/v) SDS

2.2.2.7 Mini-2D-Gelelektrophorese

Die Separierung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in der 1. Dimension erfolgte mittels der „Non-equilibrium pH gradient electrophoresis“ (NEPHGE). Die Gele der 1. Dimension wurden mithilfe von Kanülen 6,5 cm hoch in Glasröhrchen mit 1 mm Durchmesser gegossen. Die Röhrchen wurden mit einem Wassertropfen verschlossen und für mindestens 16 h zum Auspolymerisieren senkrecht stehen gelassen. 10 µg Proteasom wurden wie in 2.2.2.3 beschrieben gefällt, das Pellet in 10 µl 2D-Probenpuffer aufgenommen und durch mindestens 3 h Schütteln sowie intensives Pipettieren gelöst. Die Probe wurde auf die anodischen Seite des 1.Dimensions-Geles geladen und mit ca. 10 µl Übersichtungspuffer

bedeckt. Die isoelektrische Fokussierung verlief 4 h bei 400 V. Unter Zuhilfenahme von Glycerol und Druckluft wurde das 1.Dimensions-Gel aus dem Röhrchen gedrückt und anschließend in 3 ml Äquilibrationpuffer entweder 15 min inkubiert oder bei -20°C eingefroren. Eingefrorene Gele wurden nach dem Auftauen nicht zusätzlich in Äquilibrationpuffer inkubiert. In der 2. Dimension erfolgte die Proteintrennung nach dem Prinzip der SDS-PAGE mittels einem 15%igen Trenngel (2.2.2.5). Hierfür wurde das 1.Dimensions-Gel nach der Äquilibration oder dem Auftauen luftblasenfrei auf das Sammelgel gelegt und die Elektrophorese wie in 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt.

50-80 µg Proteasom wurden mittels der hochauflösenden 2D-Großgeltechnik durch Dr. Ursula Zimny-Arndt, MPIIB, separiert.

- Ampholinmix: 37,5% (v/v) Pharmalyte™ 4-6,5; 25% (v/v) Pharmalyte™ 5-8; 12,5% (v/v) Ampholine™ 7-9; 12,5% (v/v) Ampholine™ 3,5-10; 12,5% (v/v) Servalyt® 2-11
- 2D-Probenpuffer: 9 M Harnstoff; 5% (v/v) Ampholinmix; 2% (w/v) NP40; 0,3% (w/v) SDS; 70 mM DTT
- Überschichtungspuffer: 2D-Probenpuffer 1:3 verdünnt
- 2D-Acrylamidstammlösung: 28,4% (w/v) Acrylamid; 1,6% (w/v) Bisacrylamid
- 1.Dimensions-Gel: 9 M Harnstoff; 5% (v/v) Ampholinmix; 2% (w/v) NP40; 13,2% (v/v) 2D-Acrylamidstammlösung; (filtriert, entgast)
- 1.D-Anodenlösung(+): 0,01 M H₃PO₄
- 1.D-Kathodenlösung(-): 0,02 M NaOH
- Äquilibrationpuffer: 62 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (w/v) Glycerol; 2,3% (w/v) SDS; 70 mM DTT
- 2.Dimension-Gel: wie in 2.2.2.5

2.2.2.8 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (2.2.2.5, 2.2.2.6, 2.2.2.7) wurden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran überführt. Hierbei wurde das diskontinuierliche Puffer-System in der Semidry-Blotkammer angewandt. Drei in Kathodenpuffer getränkte Lagen Whatman-Papier wurden auf die Kathode der Blotkammer gelegt. Es folgten das Gel, die in 100% Methanol aktivierte PVDF-Membran sowie je zwei in Anodenpuffer II bzw. I getränkte Lagen Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 60 min. Anschließend wurde die Membran mit Bleistift markiert und beschriftet.

2.2.2.9 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen

Für den unspezifischen Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen sowie in Polyacrylamidgelen eignete sich die Coomassie-Färbung. Hierfür wurden Membranen bis zu 5 min, Gele bis zu 30 min in der Coomassie-Lösung geschwenkt. Die Gele wurden mit Coomassie-Entfärbter entfärbt, während für Membranen 50% Methanol zur Entfärbung verwendet wurde.

- Coomassie-Lösung: 30% Methanol; 10% Essigsäure; 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; (über Nacht gelöst, filtriert)
- Coomassie-Entfärber: 30% Methanol; 10% Essigsäure

2.2.2.10 Densitometrische Auswertung Coomassie-gefärbter 2D-Gele

Die mit der Großgeltechnik von Dr. Ursula Zimny-Arndt, MPIIB, erstellten Coomassie-gefärbten 2D-Gele wurden eingescannt und ohne weitere Bearbeitung der Helligkeit oder Kontraste mit der AIDA-Software ausgewertet. Für jeden einzelnen Spot wurde den Färbeverhältnissen an dieser Stelle im Gel entsprechend der Hintergrund neu definiert und subtrahiert. Die Färbeintensität einer proteolytisch aktiven Untereinheit und ihrer korrespondierenden Immuno-Untereinheit wurde auf 100% gesetzt. Aus drei Experimenten wurden die prozentualen Anteile aller Immuno-Untereinheiten an den Gesamtintensitäten der jeweiligen Paare gemittelt. Der Mittelwert stellte somit den durchschnittlichen prozentualen Anteil der Immunoproteasomen in einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion dar. Der einseitige heteroskedastische t-Test (Welch-Test) mit $p < 0,05$ wurde angewandt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion zu ermitteln.

2.2.2.11 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Durch Silberfärbung lassen sich in Polyacrylamidgelen geringere Proteinmengen nachweisen als mit der Coomassie-Färbung (2.2.2.9). Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel dreimal à 20 min in Methanol-Fixierer geschwenkt. Dieser Schritt entfiel, wenn das Gel schon Coomassie-gefärbt war. Nach dreimaligem Schütteln in 50% EtOH wurde das Gel für 1 min in 1x Reduzierer inkubiert und daraufhin dreimal für je 20 sec in MilliQ-H₂O gewaschen. Es folgten die Färbung für 20 min in Silberlösung und ein zweimaliges Waschen je 20 sec in MilliQ-H₂O. Das Gel wurde so lange in Entwickler geschwenkt, bis die Proteinspots gut sichtbar waren, und dann sofort kurz in MilliQ-H₂O gewaschen. Methanol-Fixierer stoppte die Reaktion und diente auch zur Aufbewahrung des Gels.

- Methanol-Fixierer: 50% Methanol; 12% Essigsäure; 0,05% Formaldehyd
- 10x Reduzierer: 8 mM Natriumthiosulfat; (1 Woche haltbar bei 4°C)
- Silberlösung: 12 mM Silbernitrat; 0,075% (v/v) Formaldehyd
- Entwickler: 5,7 mM Natriumcarbonat; 0,2% 10x Reduzierer; 0,05% Formaldehyd

2.2.2.12 Zuckeridentifizierung mittels Lektinen

Lektine sind Zucker-bindene Glycoproteine. „Wheat Germ Agglutinin“ (WGA) bindet GlcNAc und *Trichomonas mobilensis* Lektin (TML) erkennt Sialinsäure auf geblotteten Proteinen (2.2.2.8). Zur Detektion von GlcNAc wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit PBST1 geblockt und dann in mit PBST 1:700 verdünntem, Peroxidase-gekoppeltem WGA für 2h, RT geschwenkt. Es folgten zweimaliges Spülen sowie 4x 20 min Waschen in PBST und

Spülen in 1x PBS mit anschließender ECL-Reaktion (**2.2.4.1**). Zum Nachweis von Sialinsäure wurde die Membran über Nacht, RT mit hS-TBST2 blockiert, 2x 5 min in hS-TBST0.05 gewaschen, kurz mit Lektinpuffer gespült und dann in TML-Lektionlösung über Nacht, RT inkubiert. Nach 3x 5min Waschen mit hS-TBST0.05 wurde zur Bindung des Biotin-gekoppelten TMLs die Membran 1 h, RT mit Extravidin-Peroxidase geschüttelt, welche in hS-TBST0.05 1:2000 verdünnt war. Die ECL-Reaktion wurde nach erneutem Waschen mit 2x 5 min hS-TBST0.05 und 1x 5 min hS-TBS durchgeführt.

- PBST1: 1x PBS (**2.2.1.1**); 1% (w/v) Tween20
- hS-TBS: 20 mM Tris/HCL pH 7,4; 0,5 M NaCl
- hS-TBST0.05: hS-TBST; 0,05% (w/v) Tween20
- hS-TBST2: hS-TBST; 2% (w/v) Tween20
- Lektinpuffer: 10 mM Tris/HCL pH 7,4; 1 M NaCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1 mM MnCl₂; 2 mM NaN₃
- TML-Lektinlösung: Lektinpuffer; 5 µg/ml TML

2.2.2.13 Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten

Der Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten erfolgte mit 1 ng/µl Proteasom in Mikrotiterplatten. Die Substrate Suc-LLVY-AMC und Z-GGL-AMC wurden in 1x TEAD (**2.2.2.1**) in den finalen Konzentrationen 0 – 15,6 – 31,3 – 62,5 – 125 µM eingesetzt; die Substrate Boc-VGR-AMC sowie Z-LLE-βNA in den finalen Konzentrationen 0 – 37,5 – 75 – 150 – 300 µM. Die Ansätze wurden für 0 – ½ – 1 – 1½ – 2 – 3 – 4 – 5 h bei 37°C inkubiert und dann im Fluorimeter vermessen. Folgende Messparameter wurden gewählt: „Anzahl der Blitze“ 10, „Gain“ 30, „Extinction“ 390 nm, „Emission“ 460 nm. Die fluorogene Gruppe -βNA wurde mit „Extinction“ 355 nm, „Emission“ 405 nm gemessen.

2.2.2.14 Proteolytische Prozessierung von Modellpeptiden

Die *in vitro* Prozessierung von Modellpeptiden wurde mit drei unterschiedlichen Substraten durchgeführt. Das Peptidsubstrat „pp89“ (RLMYDMYPHFMPNTNLGPSEKRVWMS) stammt aus dem gleichnamigen Protein des murinen Cytomegalovirus (Aminosäuren 162-186), „Hsp60“ (VATISANGDKDIGNIISDAMKKVGRKGVIT) stammt aus HSP60 der Maus (Aminosäuren 171-200) und „LLO“ (AYISSVAYGRQVYLKLSTNSHS TKVKA) beinhaltet eine Sequenz des ListeriolysinO (Aminosäuren 291-317). In den Verdaus wurden 10 ng/µl Proteasom eingesetzt sowie 100 ng/µl pp89-Substrat, 25 ng/µl Hsp60-Substrat oder 30 ng/µl LLO-Substrat. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 0 – 4 – 20 h bei Verwendung von pp89 und Hsp60 bzw. für 0 – 2 – 4 – 8 h im Fall von LLO und wurde durch Zugabe von TFA auf eine Endkonzentration von 0,1% TFA und Einfrieren bei -20°C gestoppt. Als Inhibitoren wurden MG132 und AAF-CMK in der finalen Konzentration von 2 µM verwendet.

- Verdauopuffer: 20 mM Hepes pH 7,8; 2 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT

2.2.2.15 Analytische Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

10 µl der Prozessierungsansätze (2.2.2.14) wurden mittels Reverse-Phase-HPLC über eine NPS RP18 1,5 µm Säule getrennt. Der Gradient begann bei 0% HPLC-LaufmittelB für 5 min, stieg auf 40% in 20 min, dann auf 100% in 2 min. Die Flussrate betrug 500 µl/min. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

- HPLC-LaufmittelA: HPLC-H₂O; 0,1% TFA; (entgast)
- HPLC-LaufmittelB: Acetonitril; 0,1% TFA; (entgast)

2.2.3 Massenspektrometrie

2.2.3.1 Massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte

Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden die Prozessierungsprodukte massenspektrometrisch untersucht. Hierfür wurden 30 µl des Verdauansatzes (2.2.2.14) mit 20 µl des frisch angesetzten internen Peptidstandards „9GPS“ (YPHFMPNTNLGPS) vermischt und bei 4°C bis zu 30 h gelagert. Die Probenauftragung in das HPLC-System HP1100 erfolgte automatisch und die eluierten Fragmente wurden durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) direkt in das angeschlossene Tandemquadrupol Massenspektrometer mit Ionenfalle TSQ7000 injiziert (HPLC-ESI-Ionenfalle). Die Geräte wurden mit der Xcalibur-Software gesteuert. Bei der Standardmethode wurde die chromatografische Trennung in der HPLC mit 0,2 ml/min für 4 min bei 25% LaufmittelB begonnen, gefolgt vom Anstieg auf 85% LaufmittelB in 15 min. Zur Reäquilibration wurde innerhalb von 1 min auf 100% LaufmittelB erhöht, 3 min gewaschen, zum Schluss LaufmittelB innerhalb von 2 min auf die Ausgangskonzentration gesenkt und weitere 11 min gewaschen. Dieser Gradient wurde für die Verdauanalysen mit pp89- und Hsp60-Substrat verwendet. Für die Trennung des LLO-Degradationsansatzes verlief der Gradient in den obengenannten Zeitparametern allerdings von 15% bis 95% LaufmittelB. Die Flussrate wurde nach der HPLC auf 0,07 ml/min reduziert. Das Eluat der ersten 8 min des Gradientenlaufes wurde verworfen; das folgende Eluat wurde über ESI in die auf 200°C geheizte Kapillare gespritzt und im Positivmodus analysiert. Ein Scan umfasste das m/z von 300 bis 14000 in 1,8 sec („Full Scan“), demnach wurden pro Probe während der 28-minütigen Messzeit über 900 Scans durchgeführt.

- Peptidstandard: 3,1% Peptidstandard-Stammlösung in LaufmittelA
- Peptidstandard-Stammlösung: 50% Methanol; 1% Essigsäure; 10 µg/ml 9GPS
- LaufmittelA: HPLC-H₂O; 0,05% TFA
- LaufmittelB: 70% Acetonitril; 0,045% TFA

2.2.3.2 Identifizierung der Prozessierungsprodukte: Erstellung von Schnittkarten

Um einen Überblick über die von den Proteasomen generierten Peptide zu bekommen, wurde die Schnittkarte für das LLO-Substrat neu angelegt bzw. die Schnittkarten des pp89- und Hsp60-Substrates überarbeitet. Der Probenansatz hierfür sowie die HPLC-Methode

entsprachen den Angaben in **2.2.3.1**, während für diese Sequenzierungsläufe die Einstellungen des Quadrupols modifiziert wurden: Nach jedem Full Scan wurde ein isotopenauflösender Scan ± 5 m/z um das im Full Scan dominanteste m/z durchgeführt, der sogenannte „Zoom Scan“. Im sich anschließenden „MS/MS Scan“ wurde das Peptid mit diesem m/z durch Kollision mit Heliumgas fragmentiert und die entstandenen Fragmente im Scan analysiert. Der Zoom Scan lieferte die Information über die Ladungsstufe des m/z, so dass die molekulare Masse des Peptides ermittelt werden konnte. Der folgende MS/MS Scan wurde zur Sequenzierung des Peptides mit dieser Masse genutzt und diente damit der eindeutigen Identifizierung dieses Verdauproduktes: In der Kollision mit Helium brechen bevorzugt die Peptidbindungen, so dass sich viele der entstehenden Fragmente um die Masse einer Aminosäure unterscheiden. Die Differenzen zwischen den Fragmentmassen entsprechen also den einzelnen Aminosäuren und damit zusammengekommen der Sequenz des analysierten Peptides. Das Programm SEQUEST (Version 2.0) führte diese Berechnungen durch und lieferte mehrere Vorschläge, die manuell verifiziert werden mussten. Neben der Quadrupoleinstellung, immer das dominanteste m/z zu untersuchen, konnte die Einstellung auch so vorgenommen werden, dass entweder bestimmte m/z bevorzugt analysiert oder aber vollständig ausgeschlossen wurden. Die Aktivierung der „dynamic exclusion“ resultierte darin, dass ein m/z nicht mehr als z.B. dreimal hintereinander durch Zoom Scan und MS/MS Scan vermessen wurde und stattdessen die zweit- und drittintensivsten m/z untersucht wurden.

2.2.3.3 Auswertung und Kinetik der Prozessierungsprodukte

In den Quantifizierungsläufen identifizierte die LCQuan-Software ausgewählte Prozessierungsprodukte durch eine Kombination aus Retentionszeit in der HPLC und m/z der massenspektrometrischen Messung. Das Programm integrierte den so gefundenen Peak, und die erhaltenen Intensitäten wurden als Maß für die Menge des Prozessierungsproduktes in jeder Probe verwendet. Aus diesen Daten wurde in einer Zwischenauswertung mit dem Extraktor-B5-Programm eine Kinetik über die Inkubationszeit für jedes Prozessierungsprodukt erstellt.

2.2.3.4 Excel-Programm zur statistischen Analyse der Produktgenerierung

Mit den Proteasomen aus zwei unterschiedlichen Infektionsansätzen erfolgten je zwei Prozessierungsexperimente. Alle Proben eines Verdauxperimentes, die mit dem gleichen Peptidsubstrat durchgeführt wurden (**2.2.2.14**), wurden in demselben Lauf vermessen. Da aber aus gerätetechnischen Gründen die Detektionssensitivität und somit die Intensitäten zwischen den verschiedenen Läufen stark schwankten, wurden alle Peptide auf den jeder Probe zugesetzten internen Standard 9GPS (**2.2.3.1**) normiert. Aus diesen korrigierten Daten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Der einseitige heteroskedastische T-Test (Welch-Test) mit $p < 0,05$ wurde angewandt, um statistisch signifikante Unterschiede

zwischen den Mittelwerten zu erkennen. Zur Berechnung und einfacheren Handhabung der großen Datenmenge wurde mit Unterstützung von Dr. Björn Peters ein Excel-Programm in Visual Basic geschrieben.

2.2.3.5 Erstellung der Eichreihen für ausgewählte Prozessierungsprodukte

Zur Erstellung der Eichreihen für ausgewählte Prozessierungsprodukte des LLO-Substrates wurden das LLO-Substrat, der Precursor 4-14, das Epitop 6-14, das Epitop 7-14 und das Antitop 4-12 in verschiedenen Konzentrations-Zusammensetzungen gemischt und mit der HPLC-ESI-Ionenfalle nach dem in 2.2.3.1 beschriebenen Vorgehen für das LLO-Substrat analysiert. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen enthielten die in **Tab. 3** angegeben Fragmentmenge je 40 µl Probe.

Tab. 3: Konzentrations-Zusammensetzung der ausgewählten LLO-Prozessierungsprodukte für die Eichreihen. Es sind die pmol der jeweiligen synthetisierten Peptide in 40 µl Probe angegeben. Pre – Epitopprecursor; Epi – Epitope; Anti – Antitop.

	Probe	LLO-Substrat	Precursor 4-14	Epitop 6-14	Epitop 7-14	Antitop 4-12
Pre=Epi=Anti	Ia	50	1	1	1	1
	Ib	50	5	5	5	5
	Ic	50	10	10	10	10
	Id	50	20	20	20	20
Pre=Epi<Anti	IIa	50	1	1	1	5
	IIb	50	1	1	1	10
	IIc	50	5	5	5	10
	IId	50	5	5	5	20
Pre=Epi>Anti	IIIa	50	5	5	5	1
	IIIb	50	10	10	10	1
	IIIc	50	10	10	10	5
	IIId	50	20	20	20	5

2.2.3.6 Epitop-Antitop Auswertung durch Verhältnisbildung

Um eine Änderung in der Schnittpräferenz der Proteasomen festzustellen, wurde die Generierung der immunologisch relevanten Verdauprodukte wie MHC-Klasse-I Epitop und Epitopprecursor mit der Generierung von sogenannten Antitopen verglichen. Als Antitope werden im Folgenden Peptide bezeichnet, deren Produktion eine mögliche Weiterprozessierung zu immunologisch relevanten Peptiden ausschließt, weil das Antitop durch einen Schnitt innerhalb der Epitopsequenz generiert wird. Die normierten Intensitäten

von Epitop und Epitopprecursor wurden ins Verhältnis zu den normierten Intensitäten der in derselben Probe vorhandenen Antitope gesetzt. Hierdurch konnte eine Änderung im Verhältnis dieser Peptide zueinander nach der Infektion dargestellt werden.

2.2.3.7 Proteinidentifizierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie

Durch die „Peptide Mass Fingerprint“ Analyse in der MALDI-TOF Massenspektrometrie kann die Identität eines Proteins je nach der Aminosäuresequenzabdeckung eindeutig festgestellt werden. Aus Coomassie-gefärbten Gelen (2.2.2.9) wurden Banden und Spots unter keratinfreien Bedingungen ausgeschnitten. Der folgende Trypsinverdau, die Elution der Peptide aus dem Gel sowie die MALDI-TOF Messung und Auswertung wurden freundlicherweise von Dr. Katharina Janek und Dr. Sabine Baumgart durchgeführt.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Spezifische Protein- und Zuckeridentifizierung mittels Westernblotanalyse

Auf PVDF-Membran geblottete Proteine (2.2.2.8) sowie ihre posttranslationalen Modifikationen können mittels Immunodetektion durch Antikörper (Westernblot) spezifisch nachgewiesen werden. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper 2 h, RT inkubiert. Es folgten vier Waschschrte à 15 min mit Waschpuffer und die Inkubation 1 h, RT mit Peroxidasegekoppeltem sekundärem Antikörper GAR. Nach erneutem Waschen 4x 15 min und Spülen in 1x PBS wurde zur Detektion ECL-Reagenz auf die Membran gegeben und die Chemilumineszenzsignale auf einem Röntgenfilm visualisiert. Dieses Standardprotokoll wurde für die Immunodetektion von Zuckereinheiten optimiert und die entsprechenden Verdünnungen und Puffer in **Tab. 4** zusammengefasst. Bei Verwendung des Antikörpers CTD110.6 gegen O-GlcNAc wurde nach der Inkubation mit dem 1.Ak nur 3x, jedoch nach dem 2.Ak 5x für je 15 min gewaschen. Membranen, die mit dem anderen Antikörper gegen O-GlcNAc, MA-I, inkubiert werden sollten, wurden vor dem Blocken 1 h in 1x PBS auf 70°C erhitzt. Die Waschschrte wurden zudem auf 5x und 8x 10 min erhöht.

Tab. 4: Übersicht zu den verwendeten Antikörper-Verdünnungen und Puffern bei Protein- und Zuckeridentifizierung mittels Westernblot. Die Spalte „Verd.“ enthält die Verdünnung des 1. Antikörpers (1.Ak) im Verhältnis von 1 zu der angegebenen Zahl. Der 2. Antikörper (2.Ak) GAR wurde immer in der Verdünnung 1:10000, der 2. Antikörper RAM immer in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Für alle Verdünnungen wurde der in der Spalte „Ak-Puffer“ genannte Puffer verwendet. Bei Benutzung von MA-I wurde die Verdünnung des 1.Ak und das anschließende Waschen mit hS-PBST durchgeführt, während beim 2.Ak PBST genutzt wurde.

1.Ak	Verd.	2.Ak	Ak-Puffer	Blockpuffer	Waschpuffer
anti-Delta	20000	GAR	PBST-M2	PBST-M5	PBST
anti-LMP2	1000	„	„	„	„
anti-LMP7	30000	„	„	„	„
anti-MC14	5000	„	„	„	„

anti-MB1	7000	„	„	„	„
anti-MECL1	2000	„	„	„	„
anti-ClpC	1000	„	„	„	„
CTD110.6	5000	RAM	TBST-BSA2	TBST-BSA4	TBST
MA-I	5000	„	hS-PBST, PBST	hS-PBST-BSA	hS-PBST, PBST

- PBST: 1x PBS (**2.2.1.1**); 0,1% (w/v) Tween20
- PBST-M2: PBST; 2% (w/v) Milchpulver
- PBST-M5: PBST; 5% (w/v) Milchpulver
- TBST: 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% (w/v) Tween20
- TBST-BSA2: TBST; 2% (w/v) BSA
- TBST-BSA4: TBST; 4% (w/v) BSA
- hS-PBST: 450 mM NaCl; 3 mM KCl; 5 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄ (pH 7,2 mit HCl einstellen)
- hS-PBST-BSA: hS-PBST; 3% (w/v) BSA
- ECL-Reagenz: 0,1 M Tris/HCl pH 8,5; 1,25 mM Luminol; 0,2 mM Coumarinsäure; 0,1% (v/v) H₂O₂; (2 Wochen bei 4°C haltbar; Luminol und Coumarinsäure als Stammlösungen in DMSO bei -20°C lagern)

2.2.4.2 Immunopräzipitation von radioaktiv markierten 20S Proteasomen

Aus den in **2.2.6.5** und **2.2.6.6** hergestellten radioaktiv markierten Zell-Lysaten wurden 20S Proteasomen mittels Immunopräzipitation isoliert. Dazu wurden 10 µl Lysat aus der ¹⁴C-Markierung und 5 µl Lysat der ³⁵S-Markierung im Scintillationszähler vermessen. Der 700 µl Präzipitationsansatz bestand aus 5x10⁶ cpm ¹⁴C-Lysat, bzw. 1x10⁷ cpm ³⁵S-Lysat, 143 µg/ml BSA, 5 µl anti-K08 Antikörper sowie 1x PIC Complete und wurde mit IP-Lysepuffer (**2.2.6.5**) aufgefüllt. Die Proteasom-Antikörper-Bindung erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rollator. Am nächsten Tag wurde 1/10 Volumen ProteinA/G-Sepharose50% zugegeben und die Antikörper-ProteinA/G-Bindung in weiteren 2 h auf dem Rollator bei 4°C vollzogen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 4°C, 2 min, 2000 xg pelletiert und der Überstand verworfen. Es folgten dreimaliges Waschen mit 200 µl RIPA-Puffer und je 5 min Inkubationen auf dem Rollator bei 4°C; anschließend wurde die Prozedur mit PBS und zuletzt mit MilliQ-H₂O wiederholt. Die Sepharose wurde in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer 5 min aufgekocht und die im Probenpuffer denaturierten Proteine auf ein SDS-Gel (**2.2.2.5**) geladen. Das Gel wurde zur Fixierung der Proteine 15 min in Coomassie-Entfärber (**2.2.2.9**) geschwenkt, dann zur Verstärkung des radioaktiven Signals 30 min in Amplify inkubiert und hinterher auf Whatman-Papier getrocknet. Die radioaktiven Signale wurden auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

- ProteinA/G-Sepharose50%: 40% (v/v) ProteinA-Sepharose; 10% (v/v) ProteinG-Sepharose; 50% 1x PBS

- RIPA-Puffer: 1x PBS; 1 mM EDTA; 1% (w/v) NP40; 0,5% (w/v) Na-Doc; 0,1% (w/v) SDS
- 2x SDS-Probenpuffer: 50% 4x SDS-Probenpuffer (**2.2.2.5**)

2.2.4.3 Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenzen wurden freundlicherweise im Rahmen eines gemeinsamen Projektes von Dagmar Oberbeck-Müller, MPIIB, erstellt. Die 5 µm dicken Gefrierschnitte der Gewebe wurden 10 min in 4% Paraformaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Gewebeschnitte dreimal 5 min mit 50 mM NH₄Cl in 1x PBS inkubiert und anschließend durch 30 min 0,1% NP40 in 1x PBS permeabilisiert. Die Blockierung erfolgte durch 15 min Inkubation mit 15% FCS. Die primären Antikörper anti-LMP2, anti-LMP7 oder anti-Mec11 wurden für 1 h in einer 1:75 Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Der sekundäre Antikörper war Cy2-gekoppelt und wurde 45 min in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt. Es folgte die Inkubation mit dem Antikörper anti-F4/80 für 45 min in der Verdünnung 1:50 und dann die Inkubation mit dem sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper für 45 min in einer Verdünnung von 1:200.

2.2.4.4 Bio-Plex Immunoassay zur Cytokinbestimmung aus Serum und den Organhomogenaten

Die Bestimmung der Cytokine im Serum und in den Organenhomogenaten wurde im Rahmen einer Kooperation von Thorsten Joeris, MPIIB, ausgeführt. Blut wurde in Serum-Separationsgefäßen gesammelt, 30 min zur Gerinnung stehen gelassen und dann bei 10000 xg für 5 min zentrifugiert. Das so erhaltene Serum wurde in Serum Diluent verdünnt, während die Organhomogenate (**2.2.1.4**) mit PBS auf 0,9 mg/ml gebracht wurden. Die Cytokinbestimmung erfolgte im Bioplex Bead Array System nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 RNA-Isolation aus RMA-Zellen

Für die Isolation von RNA wurden 2×10^6 Zellen bei 4°C, 3 min, 250 xg pelletiert und in dem „HighPureRNA Isolation Kit“ eingesetzt. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

5 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden mit 50 µM Oligo-dT-Primern in einem 17 µl Ansatz mit DEPC-H₂O 10 min bei 30°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit final 1 mM dNTPs, 1,6 U/µl RNAsin, 12 U/µl Reverse Transkriptase und dem dazugehörigen Puffer auf 25 µl gebracht. Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C, 1 h mit

anschließender Kühlung auf 4°C, 2 min und einer Inaktivierung der Transkriptase bei 95°C, 2 min. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.3 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion

Ein Standard-Ansatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beinhaltete je 0,5 µM des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, 200 µM dNTPs, 10% DMSO und den der Polymerase entsprechenden Puffer in einfacher Konzentration. Je nach Aufgabenstellung wurden 1 U Taq-Polymerase, 3 U Pfu-Polymerase oder 2,6 U HighFidelity-Polymerase eingesetzt. 0,5 ng Plasmid-DNA (2.2.5.10) oder mindestens 4 µl cDNA (2.2.5.2) wurden als Matrize verwendet. Das PCR-Programm begann mit einem einmaligen 5minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C, an den sich 30 Zyklen von Denaturierung bei 95°C für 1 min, Annealing 1 min und Synthese bei 72°C anschlossen. Für die Dauer des Syntheseschrittes wurde 1 min pro 1 kb Produkt kalkuliert; bei der Pfu-Polymerase jedoch 1 min pro 0,5 kb Produkt. Vor der Kühlung bei 4°C erfolgte noch ein zusätzlicher Syntheseschritt von 10 min. Bei Verwendung der Pfu-Polymerase wurden in diesen letzten Syntheseschritt noch 0,1 U Taq-Polymerase zugegeben, um A-Überhänge zu generieren.

2.2.5.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA mittels sequenzspezifischer Restriktionsenzyme wurde in einem Volumen von 15 µl bei 37°C für 1 h durchgeführt. Pro 1 µg DNA wurde 1 U des Enzyms, der dazugehörige Puffer in einfacher Konzentration sowie 0,1 µg/µl BSA eingesetzt. Die Reaktion wurde entweder durch Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65°C oder durch Gelextraktion der elektrophoretisch getrennten DNA (2.2.5.5, 2.2.5.6) gestoppt.

2.2.5.5 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Probe wurde mit DNA-Probenpuffer versetzt und in einem Agarosegel bei einer Spannung von 120 V in 1x DNA-Laufpuffer aufgetrennt. Die DNA wurde auf einem UV-Tisch visualisiert.

- 6x DNA-Probenpuffer: 1x DNA-Laufpuffer; 50% (w/v) Glycerol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 0,1% (w/v) Xylencyanol
- Agarosegel: 0,8%, 1,5% oder 2% (w/v) Agarose; 0,2 µg/ml Ethidiumbromid; 1x DNA-Laufpuffer
- 50x DNA-Laufpuffer: 2 M Tris/Essigsäure pH 8,0; 50 mM EDTA

2.2.5.6 Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen und Agarosegelen

Zum Aufreinigen der DNA aus einer PCR (2.2.5.3) oder Spaltung (2.2.5.4) wurde das „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach Anleitung des Herstellers verwendet. Entstanden bei einer Spaltung mehrere Fragmente, wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.5.5), die interessierende Bande unter reduzierter UV-Lichtintensität aus dem

Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des oben genannten Kits extrahiert.

2.2.5.7 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Um eine Religation der Vektor-DNA bei ungerichteter Klonierung zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert. 16 µl des geschnittenen und isolierten Vektors (2.2.5.6) wurden in zwei sequentiellen Zyklen mit je 1 U der Shrimp Alkalischen Phosphatase für je 30 min, 37°C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65°C für 15 min wurde die Reaktion gestoppt.

2.2.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

Für die Ligation wurden Vektor (2.2.5.7) und Fragment (2.2.5.6) im Verhältnis 1:3 nach Mengenabschätzung im Agarosegel eingesetzt. Der Ligationsansatz enthielt außerdem 400 U T4 DNA Ligase und den dazugehörigen Puffer in einfacher Konzentration in einem Volumen von 20 µl. Bei der Ligation von PCR-Produkten wurde das „TOPO TA Cloning®“ Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion beider Ligationsprotokolle erfolgte bei 16°C für mindestens 16 h.

2.2.5.9 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Chemisch kompetente *Escherichia coli* DH5α Zellen wurden auf Eis aufgetaut mit 1 µg Plasmid-DNA (2.2.5.10), dem gesamten TA-Cloning-Ansatz oder 10 µl Ligationsansatz (2.2.5.8) versetzt, vorsichtig gemischt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec und einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl sowie der pelletierte Rest auf Antibiotika-haltigem LB-Agar, für die Blau/Weiß-Selektion auf b/w-LB-Agar, ausplattiert und bei 37°C 16 h inkubiert.

- SOC-Medium: 2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 20 mM Glucose, 20 mM MgCl₂, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl; steril filtriert
- LB-Agar: 1,5% (w/v) Bacto-Agar; 1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 17,1 mM NaCl; (autoklaviert; 50 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanaycin wurden frisch zugesetzt)
- b/w-LB-Agar: LB-Agar; 80 µg/µl X-Gal; 0,2 mM IPTG
- X-Gal: 40 mg/ml in DMF

2.2.5.10 Präparation von Plasmid-DNA

Nach der Transformation wurden 8-12 gewachsene Klone, bei der Blau/Weiß-Selektion 12 der weißen und hellblauen Klone über Nacht in 3 ml Antibiotika haltigem LB-Medium angezogen. Aus 2 ml der Vorkulturen wurde die transformierte DNA mithilfe des „QIAGEN Plasmid Mini Kits“ unter Verwendung eines verkürzten Protokolls isoliert. Hierbei wurde nach der Zugabe der Puffer P1, P2 und N3 und anschließender zehnminütiger Zentrifugation

bei 19000 xg die DNA direkt aus dem Überstand mit 1 Vol Isopropanol gefällt. Mit dem Rest der Vorkultur wurden 200 ml des Antibiotika-haltigen LB-Medium angeimpft. Die DNA-Präparation aus der Hauptkultur wurde anhand des vollständigen Protokolls des „QIAGEN Plasmid Midi Kits“ durchgeführt. Die DNA wurde in sterilem MilliQ-H₂O aufgenommen.

- LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 17,1 mM NaCl; (autoklaviert; 50 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin wurden frisch zugesetzt)

2.2.5.11 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte im Photometer durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}). Die Konzentration der DNA errechnete sich aus dem A_{260} -Wert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Faktor 0,05 µg/µl, da dieser Faktor der DNA-Konzentration bei $A_{280} = 1$ entspricht. Der Faktor für die Berechnung der RNA-Konzentration betrug 0,04 µg/µl.

2.2.5.12 Zusammenlagerung einzelsträngiger siRNA

Die einzelsträngigen siRNAs wurde mit DPEC-H₂O auf 50 µM gebracht. Je 30 µl der komplementären siRNAs wurden mit 15 µl Annealing Puffer für 2 min bei 95°C erhitzt. Die Abkühlung erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur und die nun doppelsträngige siRNA wurde bei -20°C gelagert

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Kultur von RMA-Zellen

Die RMA-Zelllinie stammte von einem T-Zellen Lymphom aus C57Black/6 Mäusen des H-2^b Haplotyps. RMA-Zellen wuchsen in Suspension mit einer ungefähren Teilungsrate von dreimal in 24 h. Sie wurden in RPMI-Medium unter Zusatz von beta-Mercaptoethanol in Flaschen mit leicht aufgedrehtem Verschluss kultiviert. Das Umsetzen erfolgte bei einer Dichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml an jedem zweiten bis dritten Tag durch direktes Überführen der Zellen in frisches Medium. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung ermittelt.

- RMA-Medium: RPMI-Medium; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; 50 µM beta-Mercaptoethanol
- Trypanblau: 25% Trypanblau-Stammlösung; 75% PBS

2.2.6.2 Einfrieren und Auftauen von RMA-Zellen

Zum Einfrieren wurden 2×10^6 Zellen für 3 min, 4°C, 250 xg pelletiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Der Gefrierprozess wurde bei -80°C in Einfrierboxen verlangsamt. Über längere Zeiträume wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurde durch Schütteln und Erwärmen in der Hand zügig

aufgetaut, sofort in 10 ml vorgelegtem RMA-Medium verdünnt, bei 4°C, 250 xg, 5 min zentrifugiert und in 3 ml RMA-Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entsprechend ihres Wachstums gesplittet.

- Einfriermedium: RPMI-Medium; 40% FCS; 10% DMSO

2.2.6.3 Lyse der RMA-Zellen für Präparation von 20S Proteasomen

Die RMA-Zellen wurden für 3 min, 4°C, 250 xg pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann bei -80°C eingefroren. Die Pellets wurden unter Zugabe von Lysepuffer (2.2.1.3) aufgetaut, gepoolt und durch mehrmaliges Douncen aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 45000 xg, 30 min, 4°C zentrifugiert und der Überstand direkt für die 20S Proteasomenpräparation (2.2.2.1) verwendet.

2.2.6.4 Elektroporation mit siRNA

Pro Transfektionsansatz wurden 5×10^6 Zellen pelletiert, in 300 µl RMA-Medium (2.2.6.1) aufgenommen und in die Elektroporationskuvette überführt. Nach der Zugabe der doppelsträngigen siRNA (2.2.5.12) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit 350 V bei 0,975 F durchgeführt und die Zellen danach sofort in 10 ml vorgelegtes RMA-Medium gegeben. Nach 24 h wurde die Lebend-Zellzahl bestimmt, 2×10^6 Zellen für 3 min, 4°C, 250 xg abzentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

2.2.6.5 Markierung von Proteinen in RMA-Zellen mit ^{14}C

Die RMA-Zellen wurden gezählt, zweimal mit PBS bei 4°C, 3 min, 250 xg gewaschen und dann in Glc⁻-Medium aufgenommen, so dass die Konzentration 5×10^6 Zellen/ml betrug. Zu 2 ml Zellen wurden 100 µl ^{14}C -Glucosamin gegeben; dies entsprach einer finalen Konzentration von 10 µCi/ml. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei 37°C wurden die Zellen bei 250 xg geerntet, zweimal mit PBS gewaschen, dann in IP-Lysepuffer aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren und nach 5minütiger Inkubation bei RT lysiert. Im Anschluss daran wurden die lysierten Zellen bei 500 xg zentrifugiert, der Überstand mit final 1x PIC Complete versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

- Glc⁻-Medium: DMEM-Glc⁻-Medium; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; 50 µM beta-Mercaptoethanol; 2mM L-Glutamin
- IP-Lysepuffer: 0,5% NP40 in 1x PBS

2.2.6.6 Markierung von Proteinen in RMA-Zellen mit ^{35}S

Die RMA-Zellen wurden gezählt, zweimal mit PBS bei 4°C, 3 min, 250 xg gewaschen und dann in Met⁻-Medium aufgenommen, so dass die Konzentration $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml betrug. Die Zellen wurden 1 h in dem Mangelmedium inkubiert, bevor 40 µl ^{35}S -Methionin zu einer

finalen Konzentration von 0,4 mCi hinzugegeben wurden. Nach einer Markierungszeit von 1 h wurde das radioaktive Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in demselben Volumen RMA-Medium (**2.2.6.1**) aufgenommen. Nach weiteren 4 h Inkubation wurden die Zellen wie in **2.2.6.5** beschrieben geerntet und lysiert.

- Met⁻-Medium: RMPI-Met⁻-Medium; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakteristika der *Listeria monocytogenes* Infektion in Mäusen

Proteasomen erfüllen die für Zellen lebensnotwendige Funktion des Proteinabbaus und sind deshalb in allen Körperzellen zu finden. Es konnten jedoch organspezifische Unterschiede in Struktur und Funktionsweise der 20S Proteasomen nachgewiesen werden (Kuckelkorn et al., 2002). In einem murinen *Listeria monocytogenes* Infektionsmodell wurde deshalb untersucht, ob diese Unterschiede statischer Natur sind oder ob sich die Struktur und die Funktion der Proteasomen in den entsprechenden Organen ändern können. Wildtypmäuse des Stammes C57Black/6 entwickelten eine Listeriose, welche zwischen den Tagen 6 und 8 nach der intravenösen Injektion von 5×10^3 cfu *L. monocytogenes* ihren Höhepunkt erreichte. Am Tag 27 p.i. (post Infektion) waren die Wildtypmäuse wieder symptomfrei. Mäuse des C57Black/6 Stammes mit Deletionen des IFN γ -Rezeptorgenes (I-Tiere) hingegen verstarben am Tag 4 oder 5 p.i., und C57Black/6 Mäuse mit Defizienzen der TNF-Rezeptoren (T-Tiere) erlagen der Listeriose bereits am Tag 3 p.i..

Gelangen *Listeria* nach einer oralen Infektion über den Darm oder nach einer intravenösen Infektion direkt in das Blut, befallen sie primär Makrophagen. Diese transportieren die Krankheitserreger in Leber und Milz, die beiden durch die *L. monocytogenes* Infektion am schwersten betroffenen Organe. In allen Mäusen war ab Tag 2 p.i. die Milz vergrößert und wie die Leber mit weißen *Listeria*-Granuloma übersät (**Abb. 7**).

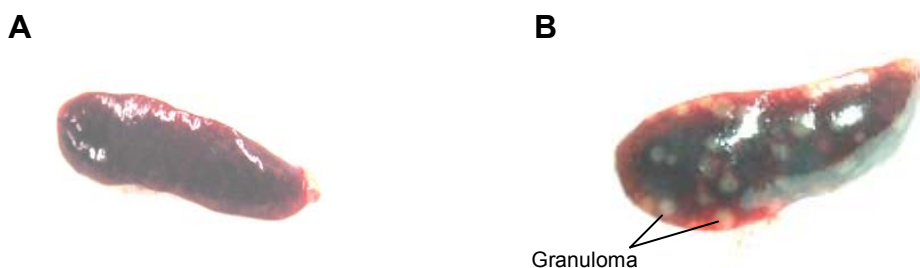


Abb. 7: Milz. (A) Gesunde Milz einer Maus. (B) Milz einer *L. monocytogenes* infizierten Maus mit den typischen weißen Granuloma.

Um den Verlauf der Listeriose nach der Infektion zu charakterisieren, wurden die Bakterientiter in den Organen bestimmt. Am Tag 2 p.i. konnten in Leber und Milz der Wildtypiere hohe *L. monocytogenes* Titer nachgewiesen werden, die am Tag 6 p.i. wieder rückläufig waren (**Abb. 8A**). In den I-Tieren lagen die *L. monocytogenes* Titer am Tag 2 p.i. schon um mindestens eine Größenordnung über denen der Wildtypmäuse und reduzierten sich nicht bis zum infektionsbedingten Tod (**Abb. 8B**). Zudem wurden auch Colon und Dünndarm der I-Tiere von *Listeria* besiedelt, was darauf hindeutete, dass die I-Tiere die sich ausbreitenden Erreger nicht eindämmen konnten.

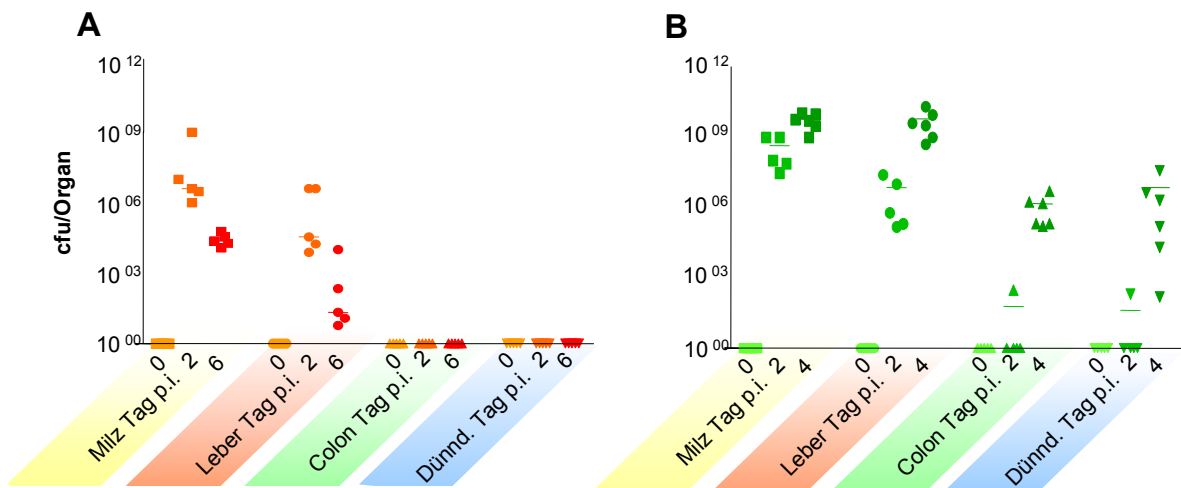


Abb. 8: *Listeria monocytogenes* Titer in den Organen. (A) Wildtypmäusen und (B) I-Tieren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Organe entnommen. In diesen Organen wurde die Anzahl der *L. monocytogenes* Kolonie-bildenden-Einheiten (cfu) bestimmt. Eine Markierung entspricht einem Tier; die waagerechten Striche geben die Mittelwerte auf der logarithmischen Achse an.

Ein wichtiger Infektionsparameter ist die Serumkonzentration des proinflammatorischen Cytokins IFN γ . Am Tag 2 p.i. stieg die Serumkonzentration von IFN γ in den Wildtyptieren auf ca. 1200 pg/ml Serum und in den I-Tieren auf ca. 2000 pg/ml Serum an (**Abb. 9**). Dieser Unterschied könnte durch die bei den IFN γ -Rezeptor-defizienten Mäuse fehlende negative Rückkopplung erklärt werden, die somit der fortwährenden IFN γ -Produktion nicht entgegen wirkte (Schroder et al., 2004). Am Tag 6 p.i. war bei den Wildtyptieren der Serumspegel wieder unter das Detektionslimit gefallen, und auch in den I-Tieren war er am Tag 4 p.i. deutlich gesunken.

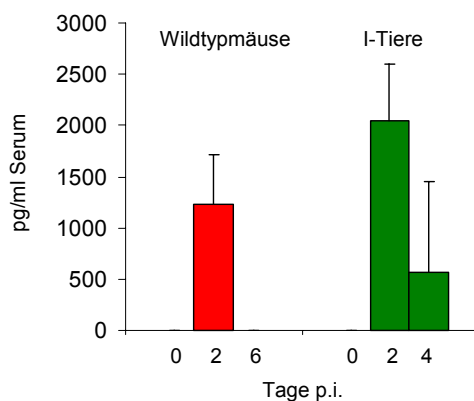


Abb. 9: IFN γ -Spiegel im Serum nach der *L. monocytogenes* Infektion. Die IFN γ -Konzentration wurde in pg pro ml Serum an verschiedenen Tagen nach der Infektion der Wildtypmäuse (rot) und I-Tiere (grün) bestimmt.

3.2 Funktionsanalyse der aus Gewebe isolierten Proteasomen

Eine wichtige Aufgabe des Proteasomensystems ist die Generierung von Peptiden, welche durch Bindung an MHC-Klasse-I Moleküle immunologische Bedeutung erlangen. Die Funktion der Proteasomen kann somit durch die Analyse der von ihnen generierten Peptide charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden oligomere Peptidsubstrate *in vitro* mit den aus Gewebe isolierten Proteasomen inkubiert und die entstandenen Produkte mittels HPLC getrennt und massenspektrometrisch untersucht.

Im Folgenden werden die aus Leber isolierten 20S Proteasomen vereinfacht als „Leberproteasomen“ bezeichnet, die aus Milz isolierten 20S Proteasomen als „Milzproteasomen“ und so fort. Dem Zusammenhang entsprechend werden z.B. 20S Proteasomen, die aus den vor der Infektion entnommenen Geweben präpariert wurden, „Tag 0 Proteasomen“ genannt. Ebenso werden als „Tag 2 p.i. Proteasomen“ diejenigen 20S Proteasomen bezeichnet, die aus Organen isoliert wurden, welche am zweiten Tag nach der Infektion mit *L. monocytogenes* entnommen worden waren und so fort. Weiterhin werden 20S Proteasomen, die aus den Organen der I-Tiere oder T-Tiere stammen, mit „I-Tier Proteasomen“ bzw. „T-Tier Proteasomen“ abgekürzt.

3.2.1 Reinheit der Proteasomenpräparationen

Um die Ergebnisse der *in vitro* Prozessierungsexperimente eindeutig der proteasomalen Funktion zuschreiben zu können, musste ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen möglicherweise co-angereicherter Proteasen die Ergebnisse der Funktionsanalyse beeinflussen.

Die Durchführung der nativen Gelelektrophorese in Gradientengelen ermöglichte es, die ca. 700 kDa großen 20S Proteasomen zusammen mit potentiell kontaminierenden kleineren Proteasen nachzuweisen. So könnte z.B. das im Dünndarm sehr abundante und hochaktive Trypsin in Proteasomenisolationen aus diesem Organ in Spuren vorhanden sein und daher ein Problem darstellen. Der Test auf Trypsin-ähnliche Aktivität deutete jedoch niemals – außer im Molekulargewichtsbereich der 20S Proteasomen – proteolytische Aktivitäten an. Die in **Abb. 10** dargestellten repräsentativen Dünndarmproteasomen waren funktionell aktiv, nicht mit Trypsin verunreinigt und wurden, wie die densitometrische Auswertung der Coomassiegefärbten Gele ergab, in gleichen Mengen auf das Gel aufgetragen. Dies gewährleistete außerdem, dass die Proteinquantifizierungen korrekt waren und somit gleiche Proteasomenmengen in den Funktionsanalysen eingesetzt wurden.

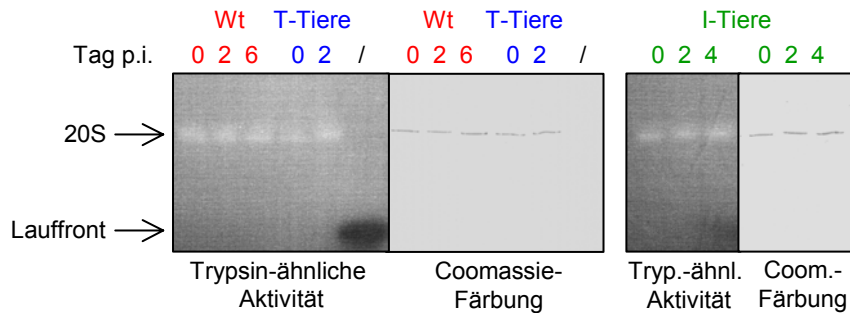


Abb. 10: Dünndarmproteasomen im Nativgel mit Aktivitätstest. 0,7 µg der aus Dünndarm isolierten 20S Proteasomen wurden in nicht-denaturierenden Gelen aufgetrennt, Aktivitätstests auf Trypsin-ähnliche Aktivität unterzogen und anschließend mit Coomassie gefärbt. rot – Wildtypmäuse (Wt); blau – T-Tiere; grün – I-Tiere; / – mit Bromphenolblau beladene Bahn.

Eine weitere mögliche Kontamination der Proteasomenpräparationen könnte auf Grund ihrer Größe die Aminopeptidase TPPII darstellen. TPPII ist ein großer cytosolischer Enzymkomplex, der in allen Säugerzellen exprimiert wird (Geier et al., 1999). Durch seine in Einzelfällen nachgewiesene endoproteolytische Aktivität (Geier et al., 1999; Seifert et al., 2003) könnte TPPII, wenn es in den Proteasomenisolationen vorhanden sein sollte, die Verdauexperimente beeinflussen. Um eine Kontamination mit TPPII auszuschließen, wurde ein dem Cytolysin LLO entstammendes 27meres Peptidsubstrat (LLO-Substrat) mit isolierten Gewebeproteasomen in Anwesenheit des TPPII Inhibitors AAF-CMK oder des Proteasomeninhibitors MG132 inkubiert. Die in der HPLC analysierten Ansätze ergaben, dass MG132 die Degradation des LLO-Substrates vollständig inhibiert, da keine Abnahme des LLO-Substrates zu verzeichnen war (**Abb. 11**). Der TPPII Inhibitor hingegen besaß keinen Einfluss auf die Degradation des Substrates, weil nach 8 h kaum noch LLO-Substrat nachweisbar war, was der achtstündigen Degradation in dem Ansatz ohne Inhibitoren entsprach. Dies besagt, dass ausschließlich die Proteasomen in den Präparationen für die Degradation des LLO-Substrates verantwortlich waren und somit keine kontaminierende TPPII-Aktivität vorlag.

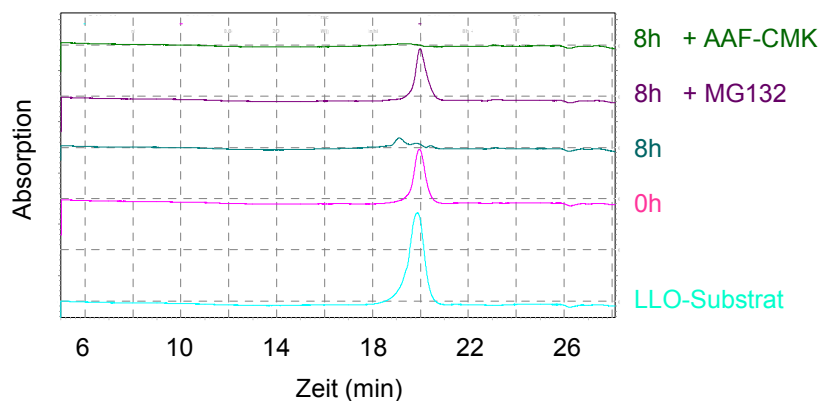


Abb. 11: HPLC-Profil der LLO-Degradation mit Inhibitoren. LLO-Substrat wurde mit Tag 6 p.i. Leberproteasomen der Wildtypmäuse unter Zugabe von MG132 oder AAF-CMK verdaut und anschließend mittels HPLC analysiert. Von unten nach oben: hellblau – LLO-Substrat, Positivkontrolle; rosa – 0 h Verdau ohne Inhibitoren; dunkeltürkis – 8 h Verdau ohne Inhibitoren; violett – 8 h Verdau mit MG132; grün – 8 h Verdau mit AAF-CMK.

L. monocytogenes besitzt einen dem Proteasom strukturell ähnlichen Proteasekomplex, den Clp-Komplex (De Mot et al., 1999). Um zu zeigen, dass in der Proteasomenisolation aus infizierten Geweben der Clp-Komplex nicht mit angereichert worden war, wurden die isolierten Proteasomen im Westernblot auf das Vorhandensein einer Clp-Untereinheit getestet. Die proteolytisch aktive Untereinheit ClpP ist mit einer Größe von 22 kDa in der SDS-PAGE nicht von proteasomalen Untereinheiten zu unterscheiden und ist deshalb für den Clp-Nachweis nicht geeignet. Da ClpP nur in Verbindung mit der Untereinheit ClpC funktionsfähig und letzteres durch ein größeres Molekulargewicht von den proteasomalen Untereinheiten einfach abzugrenzen ist (Rouquette et al., 1998), wurde ein Antikörper gegen die ClpC Untereinheit gewählt (**Abb. 12**). In der Positivkontrolle mit *L. monocytogenes* Lysat wurde eine sehr starke für ClpC spezifische Bande bei 60 kDa sowie eine schwächere Bande bei 33 kDa beobachtet. Keine der beiden Banden wurde in den Proteasomenpräparationen detektiert, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sie keine ClpC-Kontamination enthielten.

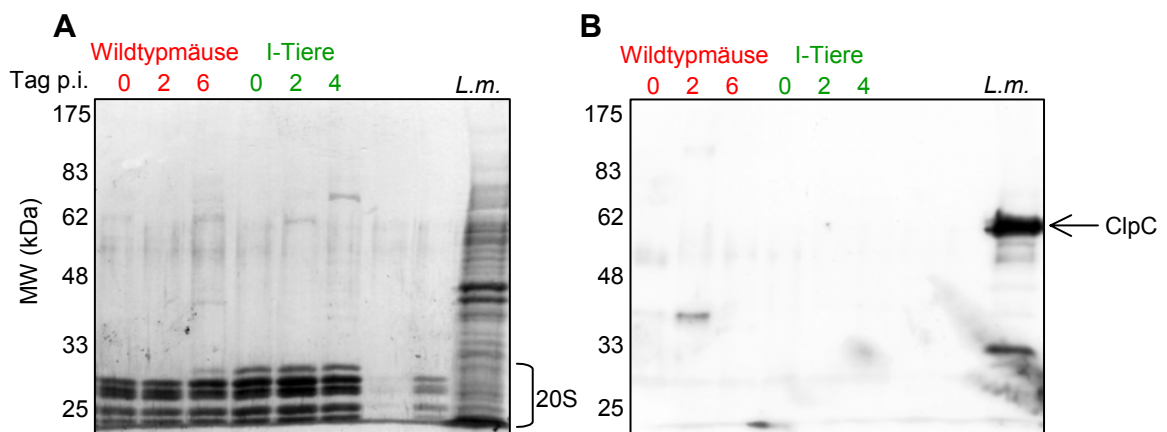


Abb. 12: Nachweis des Clp-Proteasekomplexes von *L. monocytogenes*. 1µg der aus Leber isolierten 20S Proteasomen der Wildtypmäuse und der I-Tiere sowie Lysat von 10^7 cfu *L. monocytogenes* wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit Antikörper gegen ClpC inkubiert. (A) Coomassie-gefärbte Membran. (B) Westernblot. Der Pfeil markiert die für ClpC beschriebene spezifische Bande bei 60 kDa. rot – Wildtypmäuse; grün – I-Tiere; *L.m.* – *Listeria monocytogenes* Lysat, Positivkontrolle; MW (kDa) – Molekulargewicht in Kilodalton.

Die proteolytischen Aktivitäten der isolierten Proteasomen wurden des Weiteren durch die Hydrolyse von fluorogenen Substraten bestimmt, welche von den verschiedenen aktiven Untereinheiten gespalten werden (Orlowski und Wilk, 2000). Tag 0 Leberproteasomen der Wildtypmäuse zeigten zu den Tag 2 p.i. und 6 p.i. Leberproteasomen keine drastischen Unterschiede hinsichtlich der Trypsin-ähnlichen Aktivitäten (**Abb. 13**). Die Tag 6 p.i. Proteasomen demonstrierten jedoch eine deutlich geringere Caspase-ähnliche Aktivität als die Tag 0 oder Tag 2 p.i. Proteasomen. Wurde die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität durch Spaltung des Z-GGL-AMC Substrates ermittelt, waren keine Unterschiede zwischen den

Proteasomen von den verschiedenen Tagen nach der Infektion zu detektieren; bei Einsatz des Suc-LLVY-AMC Substrates hingegen zeigten die Tag 6 p.i. Proteasomen eine reduzierte Aktivität gegenüber den Tag 0 und Tag 2 p.i. Proteasomen. Auch war bei der Spaltung des Suc-LLVY-AMC Substrates eine andere Abhängigkeit von der Substratkonzentration zu erkennen: In dem eingesetzten Konzentrationsbereich beschrieben die Aktivitäten der Tag 0 und Tag 2 p.i. Proteasomen eine sigmoidale Kurve, wohingegen die Aktivität der Tag 6 p.i. Proteasomen eher linear zur Substratkonzentration stieg. Die Hinweise auf Aktivitätsunterschiede zwischen den isolierten Proteasomen wurden nachfolgend durch *in vitro* Prozessierung von oligomeren Peptidsubstraten näher untersucht, da die Prozessierung von längeren Peptidsubstraten eher der *in vivo* Situation entspricht als die Abspaltung einer fluorogenen Gruppe von einem mit Schutzgruppe versehenen Tripeptid. **Abb. 13** veranschaulicht, dass der Einsatz gleicher Proteinmengen in den Prozessierungsexperimenten geeigneter ist als die Normierung auf die Aktivitäten, da sich hierbei die Frage stellen würde, welches Substrat in welcher Konzentration für den Abgleich herangezogen werden sollte.

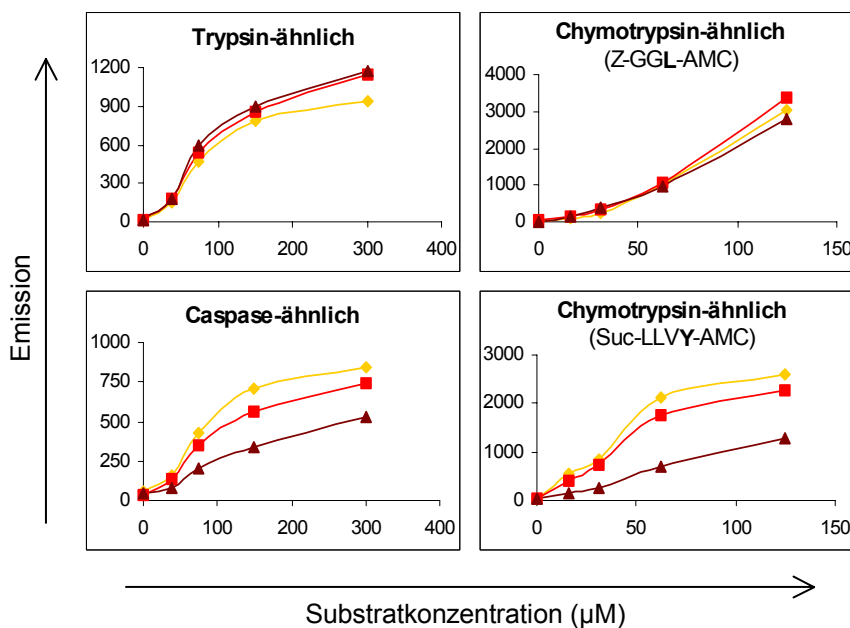


Abb. 13: Aktivitätsmessung mit fluorogenen Substraten. Leberproteasomen der Wildtyptiere wurden 60 min mit verschiedenen Konzentrationen der fluorogenen Substrate inkubiert, welche von den verschiedenen Aktivitäten der 20S Proteasomen gespalten werden. Gemessen wurde die Emission der freigesetzten fluorogenen Gruppe bei 460 nm nach Anregung bzw. bei 405 nm nach Anregung für die Messung der Caspase-ähnlichen Aktivitäten. gelbe Rauten – Tag 0 Proteasomen; rote Quadrate – Tag 2 p.i. Proteasomen; braune Dreiecke – Tag 6 p.i. Proteasomen.

Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die isolierten 20S Proteasomen aktiv waren und keine nachweisbaren Spuren kontaminierender Proteasen enthielten. Somit wurde sichergestellt, dass die folgenden *in vitro* Prozessierungsexperimente Aufschluss über die Funktionalität der isolierten 20S Proteasomen geben können.

3.2.2 Massenspektrometrische Identifizierung der Produkte aus *in vitro* Prozessierungsexperimenten

Zur Charakterisierung der proteasomalen Funktion wurden oligomere Peptidsubstrate mit den isolierten 20S Gewebeproteasomen inkubiert, die entstandenen Prozessierungsprodukte in der HPLC getrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Zu Beginn einer massenspektrometrischen Untersuchung stand die eindeutige Identifizierung der aus einem Peptidsubstrat durch die Proteasomen generierten Produkte. Dies erfolgte in Vorversuchen mittels der MS/MS Scans in den Sequenzierungsläufen. Die identifizierten Produkte wurden in einer sogenannten Schnitkarte zusammengefasst, welche die Ladungsstufen, das detektierte m/z und die Retentionszeiten enthielt. Die auf die Sequenzierungsläufe folgenden Funktionsanalysen dienten der Quantifizierung der Prozessierungsprodukte. In diesen Quantifizierungsläufen erfolgte die Identifizierung der proteasomalen Produkte nur über die vorher gesammelten und in der Schnitkarte festgehaltenen Informationen. Außerdem gab eine vollständige Schnitkarte einen Überblick über alle durch das Proteasom generierten und mit der HPLC-ESI-Ionenfalle erfassbaren Prozessierungsprodukte und erleichterte so die Entscheidung darüber, welche dieser Produkte in der Funktionsanalyse ausgewertet werden sollten.

In **Abb. 14** ist die vollständige Schnitkarte des LLO-Substrates dargestellt, dessen Sequenz dem von *Listeria monocytogenes* ins Cytosol der Wirtszellen sekretiertem ListeriolysinO₂₉₀₋₃₁₇ entstammte. Das LLO-Substrat enthielt das H-2K^b Epitop VAYGRQVYL sowie N- und C-terminal flankierende Sequenzen. In die Funktionsanalyse wurden das Substrat, die Epitope und die Epitopprecursor miteinbezogen sowie Produkte, welche durch einen Epitop- oder Precursorschnitt N- und C-terminal entstanden. Zusätzlich wurden auch zwei sogenannte Antitope ausgewertet. Hierbei handelte es sich um Fragmente, deren Entstehung die weitere Prozessierung zu einem Epitop oder Precursor verhinderte.

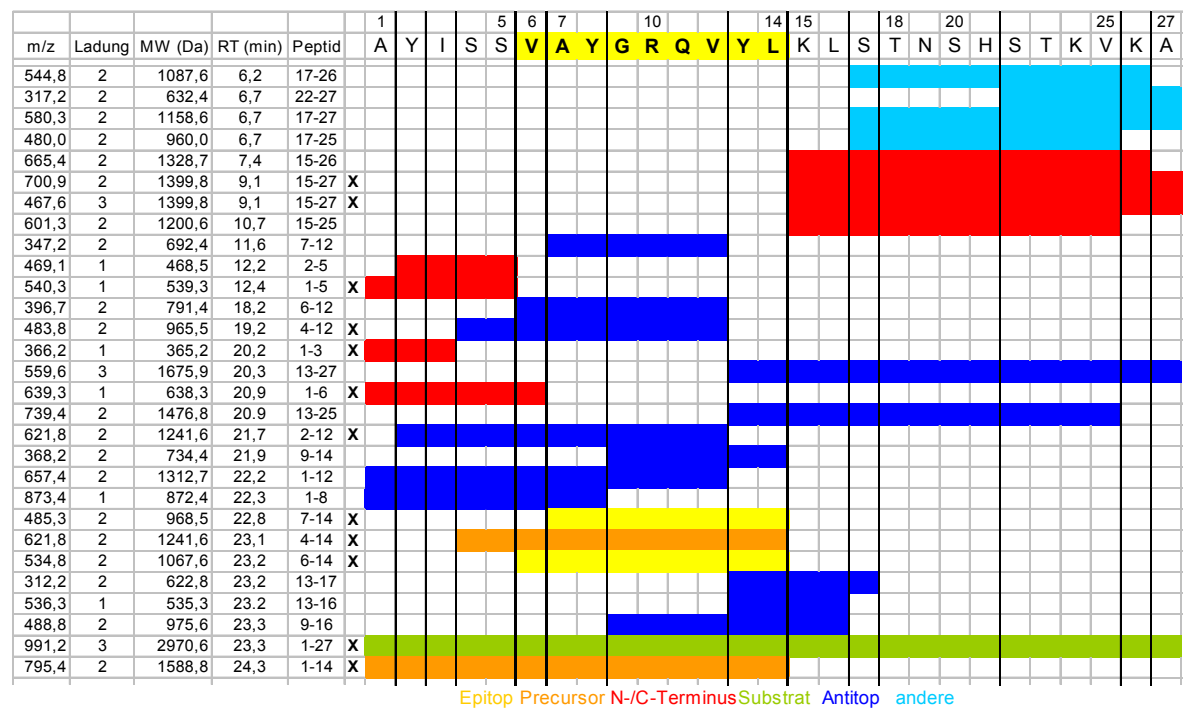


Abb. 14: Vollständige Schnitkarte des LLO-Substrates. Die Verdauungsprodukte sind nach ihrer Retentionszeit aufgelistet. Ladung – elektrische Ladungsstufe; MW (Da) – Molekulargewicht in Dalton; RT (min) – Retentionszeit in Minuten; X – Peptide, die in den Quantifizierungsläufen ausgewertet wurden.

Zusätzlich zu der Generierung des bakteriellen Fremdepitopes aus dem LLO-Substrat wurden Prozessierungsexperimente mit zwei weiteren Peptidsubstraten durchgeführt, von denen das eine ein virales Fremdepitop enthielt und das andere ein murines Selbstepitop. Dieser Ansatz sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die proteasomale Funktion möglicherweise der Infektionsart anpasst und daher bei der Infektion mit *L. monocytogenes* nur eine Auswirkung auf die Bildung des bakteriellen Epitopes zu verzeichnen wäre. Als murines Selbstsubstrat wurde das Hsp60-Substrat gewählt, welches aus den Aminosäuren 171-200 des in Mitochondrien vorkommenden Hitzeschockproteins 60 bestand und das H-2D^b Epitop KDIGNIISD umfasste (Kuckelkorn et al., 2002). Das virale pp89-Fremdsupstrat leitete sich aus dem Immediate Early Phosphoprotein 89 des murinen Cytomegalovirus ab und beinhaltete die Aminosäuren 162-186 um das H-2L^d Epitop YPHFMPTNL (Boes et al., 1994). **Abb. 15** und **Abb. 16** zeigen die Schnitkarten mit den durch MS/MS Scan verifizierten Prozessierungsprodukten des Hsp60- bzw. des pp89-Substrates, welche in den Funktionsanalysen ausgewertet wurden.

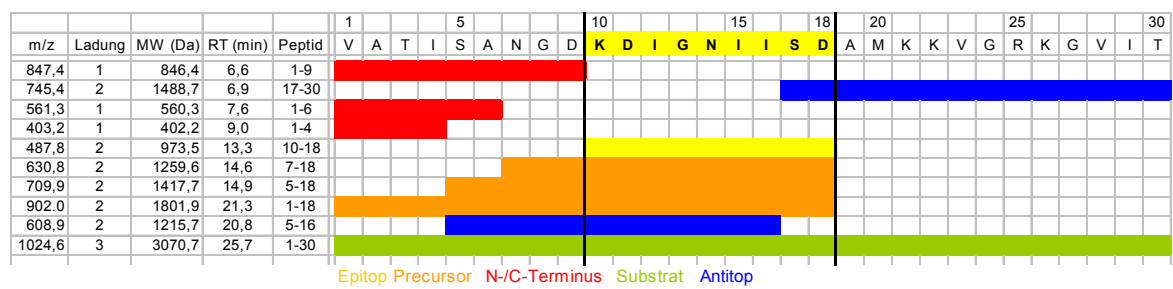


Abb. 15: Schnittkarte des Hsp60-Substrates. Die Verdauprodukte sind nach ihrer Retentionszeit geordnet. Es wurden nur die Peptide aufgelistet, welche anschließend in den Quantifizierungsläufen ausgewertet wurden. Ladung – elektrische Ladungsstufe; MW (Da) – Molekulargewicht in Dalton; RT (min) – Retentionszeit in Minuten.

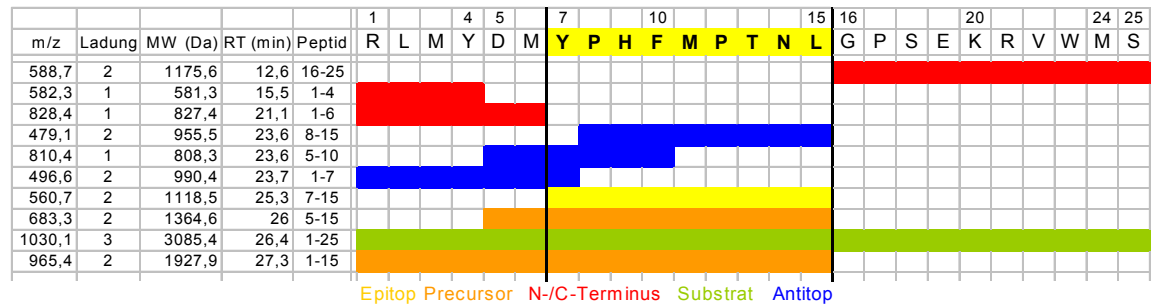


Abb. 16: Schnittkarte des pp89-Substrates. Die Verdauprodukte sind nach ihrer Retentionszeit geordnet. Es wurden nur die Peptide aufgelistet, welche anschließend in den Quantifizierungsläufen ausgewertet wurden. Ladung – elektrische Ladungsstufe; MW (Da) – Molekulargewicht in Dalton; RT (min) – Retentionszeit in Minuten.

3.2.3 Statistische Bearbeitung und Auswertung der Rohdaten

Die Auswertung eines Prozessierungsproduktes in den Quantifizierungsläufen erfolgte durch Integration der Fläche unterhalb des massenspektrometrischen Peaks, der diesem Verdauprodukt durch das in den Sequenzierungsläufen bestimmte m/z und die Retentionszeit zugeordnet werden konnte. Die integrierte Fläche wurde als Maß für die Menge des detektierten Produktes verwendet und als „Intensität“ angegeben. Da aus technischen Gründen die Sensitivität der HPLC-ESI-Ionenfalle über den Zeitraum der Datenerfassung stark schwankte, wurde die Normierung auf einen internen Standard eingeführt, um die Daten der verschiedenen Wiederholungsmessungen miteinander vergleichen zu können. Der interne Standard bestand aus einem synthetischen Peptid, dessen Masse – um Verwechslungen auszuschließen – nicht den Massen der möglichen Prozessierungsprodukte entsprach. War die Messung nun zum Beispiel sehr sensitiv, wurden alle in der Probe enthaltenen Produkte sowie der interne Standard mit größeren Intensitäten gemessen. Wie in **Abb. 17** gezeigt, brachte eine Normierung auf den internen Standard die Wiederholungsmessungen in den Bereich gleicher Intensitäten. Dieses Vorgehen ermöglichte eine statistische Analyse der Ergebnisse.

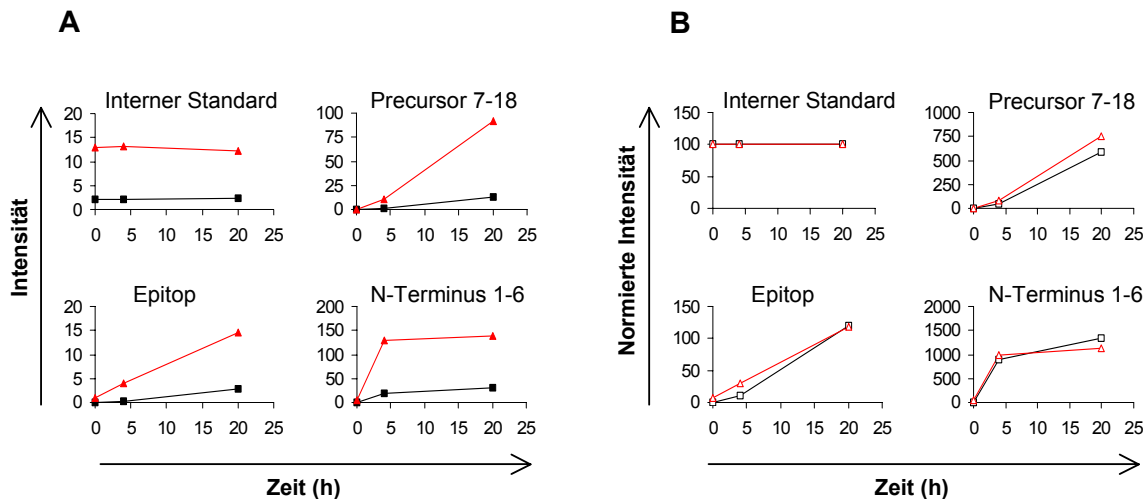


Abb. 17: Gerätebedingte Intensitätsschwankungen in der Messung mit HPLC-ESI-Ionenfalle und Normierung auf den internen Standard. Das Hsp60-Substrat wurde *in vitro* mit Tag 0 Leberproteasom der Wildtypmäuse für 4 und 20 h verdaut und anschließend mittels HPLC-ESI-Ionenfalle analysiert. Gezeigt sind die Auswertungen des internen Standards und ausgewählter Degradationsprodukte. (A) Gemessene Produktintensitäten. (B) auf internen Standard normierte Intensitäten. schwarz – 1. Messung; rot – 2. Messung.

Die Prozessierungsexperimente wurden insgesamt viermal durchgeführt, wobei die eingesetzten Proteasomen aus Organen isoliert worden waren, die von in zwei unabhängigen Ansätzen infizierten Mäusen stammten. Um die entstandenen Datenmengen besser bearbeiten zu können, wurde ein Makro-Programm für Excel in Visual Basics entwickelt. Dieses sortierte die Verdauprodukte, normierte sie auf den internen Standard und berechnete die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. Die Wahrscheinlichkeit, dass die erhaltenen Mittelwerte sich unterschieden, wurde durch einen Signifikanztest geprüft. Hierfür wurde der heteroskedastische t-Test (Welch-Test) verwendet und das Kriterium der Einseitigkeit festgelegt.

3.2.4 Auswertung der Prozessierungsexperimente

3.2.4.1 *In vitro* Prozessierung des LLO-Substrates durch Proteasomen aus den Organen der Wildtypmäuse

In den *in vitro* Prozessierungsexperimenten mit LLO-Substrat und den isolierten Proteasomen wurden die zwölf in **Abb. 14** mit X gekennzeichneten Fragmente quantifiziert. Es handelte sich hierbei um Verdauprodukte, welche durch Schnitte generiert wurden, die unter anderem die Epitope und/oder die Epitopprecursor sowie die Antitope freisetzen. Hierzu gehörten ebenfalls die an die Epitope und Precursor direkt angrenzenden N- und C-terminalen Produkte. Diese Fragmente werden im Weiteren unter dem Begriff der „immunrelevanten Produkte“ zusammengefasst. Der Übersichtlichkeit halber wird in den folgenden Abbildungen nur jeweils ein repräsentativer Vertreter eines jeden Produkttyps gezeigt (**Abb. 18A**). Für die

Darstellung wurde das Epitop 6-14 gewählt, das im Elispot eine bessere T-Zell-Aktivierung zeigte als das kürzere Epitop 7-14 (Geginat et al., 2001), der Precursor 4-14 sowie die flankierenden Fragmente N-Terminus 1-3 und C-Terminus 15-27.

Die aus den Wildtypmäusen isolierten Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i. Leberproteasomen generierten nach derselben Verdauzeit signifikant mehr immunrelevante Produkte als die Tag 0 Proteasomen (**Abb. 18B**). Auch die Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i. Colonproteasomen produzierten einen auffällig höheren Anteil der immunrelevanten Fragmente als die Tag 0 Colonproteasomen (**Abb. 19**). Der Anstieg der flankierenden Produkte konnte zwar nicht als signifikant ermittelt werden, war jedoch in den vier Wiederholungen jedes Mal als reproduzierbare Tendenz zu beobachten.

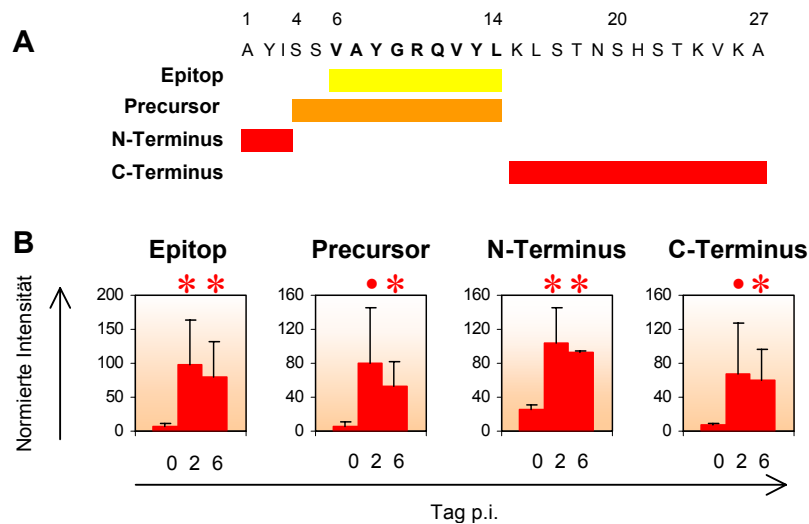


Abb. 18: *In vitro* Generierung immunrelevanter Produkte durch Leberproteasomen der Wildtypmäuse. (A) Repräsentative Prozessierungsprodukte aus dem LLO-Substrat. (B) Es werden die normierten und gemittelten Intensitäten der in (A) dargestellten Produkte nach 2 h Verdauzeit gezeigt. Sterne (*) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) und Punkte (•) markieren reproduzierbare Fragmentzunahmen bezogen auf Ansätze mit Tag 0 Proteasomen.

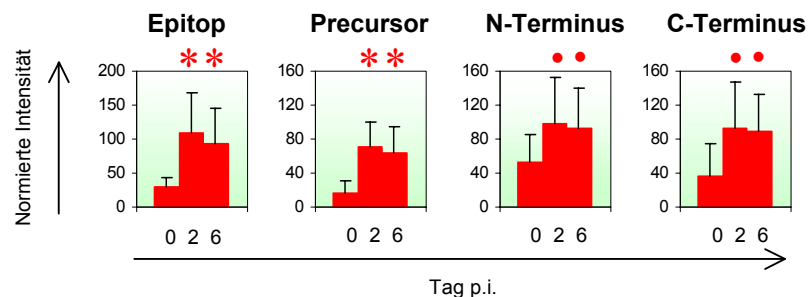


Abb. 19: *In vitro* Generierung immunrelevanter Produkte durch Colonproteasomen der Wildtypmäuse. Es werden die normierten und gemittelten Intensitäten repräsentativer Degradationsprodukte nach 2 h Verdauzeit gezeigt. Sterne (*) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) und Punkte (•) markieren reproduzierbare Fragmentzunahmen bezogen auf Ansätze mit Tag 0 Proteasomen.

Die Milzproteasomen generierten die zwölf untersuchten Fragmente bereits am Tag 0 mit ungefähr der Effizienz, wie sie die Leber- und Colonproteasomen erst nach der Infektion zeigten (**Abb. 20**). Eine weitere Steigerung der Fragmentgenerierung durch die Milzproteasomen nach der Infektion konnte jedoch nicht beobachtet werden. Der vermeintliche Anstieg in der Epitopbildung war auf die breite Streuung der Messwerte zurückzuführen und nicht eindeutig reproduzierbar.

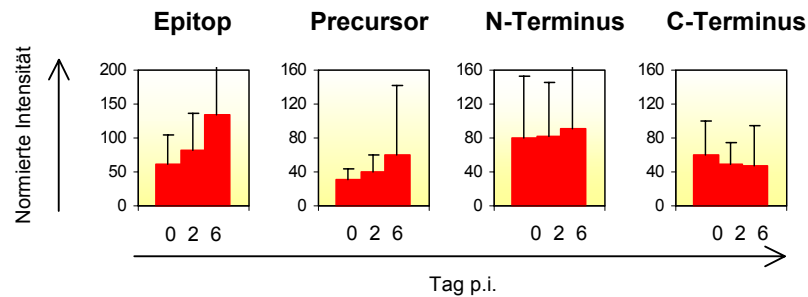


Abb. 20: *In vitro* Generierung immunrelevanter Produkte durch Milzproteasomen der Wildtypmäuse. Es werden die normierten und gemittelten Intensitäten repräsentativer Degradationsprodukte nach 2 h Verdauezeit gezeigt. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) oder reproduzierbaren Tendenzen festgestellt werden.

Im Dünndarm befindet sich in Form der Peyerschen Plaques lymphatisches Gewebe. Aus diesem Grund kann der Dünndarm als Ganzes ähnlich der Milz als lymphatisches Organ betrachtet werden. Die verstärkte Generierung der immunrelevanten Produkte durch die Tag 2 p.i. Dünndarmproteasomen im Vergleich zu den Tag 0 oder Tag 6 p.i. Dünndarmproteasomen ließ sich mit den vorliegenden Daten weder als statistisch signifikant noch als reproduzierbare Tendenz bezeichnen (**Abb. 21**). Somit zeigten auch die Dünndarmproteasomen nach der Infektion keine geänderte Effizienz bei der Bildung der immunrelevanten Peptide. Auffällig war allerdings, dass die durch Dünndarmproteasomen gebildeten Peptidmengen generell viel höher waren als die durch andere Organproteasomen erzeugten Peptidmengen.

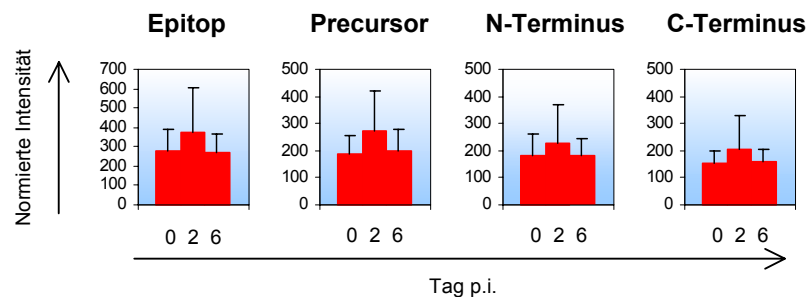


Abb. 21: *In vitro* Generierung immunrelevanter Produkte durch Dünndarmproteasomen der Wildtypmäuse. Es werden die normierten und gemittelten Intensitäten repräsentativer Degradationsprodukte nach 2 h Verdauezeit gezeigt. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) oder reproduzierbaren Tendenzen festgestellt werden.

Die Quantifizierungskinetiken der immunrelevanten Fragmente, die durch dieselben Gewebeproteasomen generiert wurden, unterschieden sich nicht voneinander. Wurde z.B. der gezeigte Precursor 4-14 verstärkt gebildet, resultierte dies in einer erhöhten Generation des N-terminalen Fragments 1-3 und des C-terminalen Fragments 15-25. Die Funktionsanalyse ergab, dass nach der *L. monocytogenes* Infektion verstärkt immunrelevante Produkte durch die Proteasomen aus den nicht-lymphatischen Organen Leber und Colon erzeugt wurden. Die Proteasomen aus den lymphatischen Geweben Milz und Dünndarm hingegen wurden durch die Infektion in ihrer Funktion nicht beeinflusst.

3.2.4.2 *In vitro* Prozessierung des LLO-Substrates durch Proteasomen aus den Organen der Rezeptor-defizienten Mäuse

Die *L. monocytogenes* Infektion von Mäusen mit der Gendelektion des IFN γ -Rezeptors (I-Tiere) führte am Tag 4 bis 5 p.i. zum Tod, während Mäuse mit Deletionen der TNF-Rezeptorgene (T-Tiere) am Tag 3 p.i. verstarben. Deshalb war es nicht möglich, wie bei den Wildtypmäusen am Tag 6 p.i. aus den Organen der Rezeptor-defizienten Tiere 20S Proteasomen zu isolieren. Stattdessen wurden aus den Geweben der I-Tiere an den Tagen 0, 2 p.i. sowie 4 p.i. und aus den Organen der T-Tiere lediglich an den Tagen 0 und 2 p.i. die Proteasomen präpariert und in den Prozessierungsexperimenten eingesetzt. Hierbei wurden dieselben Produkte quantifiziert und ausgewertet wie in den oben beschriebenen Versuchen mit den Proteasomen aus den Wildtypmäusen (vergl. **Abb. 14** und **Abb. 18A**). Da sich auch bei den I- und T-Tieren die immunrelevanten Produkte in ihrer Generierung durch dieselben Gewebeproteasomen nicht wesentlich voneinander unterschieden, wird im Folgenden stellvertretend nur die Bildung des Eitopprefixors dargestellt. Bei den I-Tieren war keine Zunahme der Prefixorbildung nach der Infektion zu beobachten: Leber- und Colonproteasomen der I-Tiere produzierten den Prefixor auf konstant niedrigem Niveau (**Abb. 22A**). Die Dünndarmproteasomen der I-Tiere generierten dieses Fragment zwar deutlich häufiger, aber immer noch etwas weniger als die Dünndarmproteasomen der Wildtypmäuse (vergl. **Abb. 21**) und der T-Tiere (**Abb. 22B**). Die T-Tier Proteasomen aus den nicht-lymphatischen Organen Leber und Colon zeigten nach der Infektion eine sichtbar vermehrte und reproduzierbare Prefixorgenerierung und verhielten sich damit wie die entsprechenden Organproteasomen aus den Wildtyptieren (vergl. **Abb. 18** und **Abb. 19**). Interessant war außerdem, dass in beiden Rezeptor-defizienten Tiermodellen die Milzproteasomen nach der Infektion wiederholt geringere Mengen an Prefixor bildeten als die Tag 0 Proteasomen.

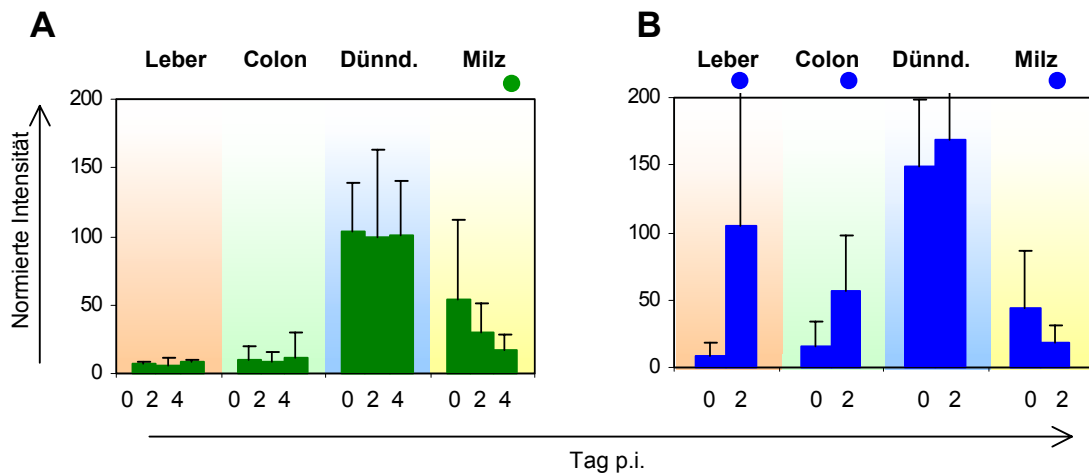


Abb. 22: In vitro Generierung des Precursors 4-14 durch die Gewebeproteasomen der Rezeptor-defizienten Mäuse. (A) I-Tiere. (B) T-Tiere. Es werden die normierten und gemittelten Intensitäten nach 2 h Verdauzeit gezeigt. Punkte (●) markieren reproduzierbare Fragmentzu- oder abnahmen bezogen auf Ansätze mit Tag 0 Proteasomen. Dünnd. – Dünndarmproteasomen.

3.2.4.3 In vitro Prozessierung des Hsp60-Substrates und des pp89-Substrates

Die Prozessierungsexperimente wurden mit dem murinen Hsp60-Selbstsubstrat und dem viralen pp89-Substrat in demselben Umfang durchgeführt wie mit dem listeriellen LLO-Substrat, um zu untersuchen, ob nur die listeriellen immunrelevanten Fragmente vermehrt produziert werden oder ob dies auch für andere Epitope und Precursor gilt. Stellvertretend für die in den Schnittkarten von Hsp60- und pp89-Substrat aufgeführten und analysierten Produkte wird jeweils nur ein Epitopprecursor besprochen: für die Produkte aus dem Hsp60-Substrat der (Hsp60)Precursor 5-18 und für die Produkte aus dem pp89-Substrat der (pp89)Precursor 5-15 (**Abb. 23**, vergl. **Abb. 15** und **Abb. 16**). Als Kontrolle für die Prozessierungsversuche mit Hsp60-Substrat und Tag 0 Wildtypproteasomen konnten die veröffentlichten Daten von Kuckelkorn *et al.* herangezogen werden, da in dieser Publikation ebenfalls Proteasomen verwendet wurden, die aus den gleichen Geweben gesunder Wildtypmäuse isoliert worden waren (Kuckelkorn *et al.*, 2002). Der Vergleich zwischen den publizierten und den in **Abb. 23A** gezeigten Resultaten mit Tag 0 Proteasomen ergab, dass sich die Ergebnisse bezüglich der Fragmentgenerierung aus Hsp60-Substrat entsprachen, und kann somit als Beispiel für die hohe Reproduzierbarkeit dieses Versuchsansatzes gelten. **Abb. 23A** veranschaulicht außerdem, dass die Proteasomen, die am Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i. aus den nicht-lymphatischen Geweben isoliert wurden, signifikant mehr (Hsp60)Precursor generierten als die Proteasomen der gleichen Organe am Tag 0, was genau so schon bei den Prozessierungsprodukten aus dem LLO-Substrat beobachtet werden konnte. Ebenfalls den Ergebnissen mit dem LLO-Substrat entsprechend wurden die Proteasomen der lymphatischen Organe Milz und Dünndarm durch die Infektion in der Prozessierung des Hsp60-Substrates

nicht beeinflusst. Außerdem generierten die Dünndarmproteasomen durchgehend größere Mengen des (Hsp60)Precursors als die Proteasomen der anderen Organe (vergl. 3.2.4.1).

Die Entstehung des (pp89)Precursors war – wie bei den Produkten der anderen Peptid-Substrate – durch die Leberproteasomen der Tage 2 p.i. und 6 p.i. gesteigert (**Abb. 23B**). Ähnlich den anderen Substraten tangierte die Infektion nicht die Generierung der Fragmente aus pp89-Substrat durch die Milz- und Dünndarmproteasomen. Es konnten jedoch zwei abweichende Beobachtungen vermerkt werden: Zum einen wurde der (pp89)Precursor durch die nach der Infektion isolierten Colonproteasomen nicht verstärkt gebildet, und zum anderen lagen die durch Dünndarmproteasomen produzierten Fragmentmengen im Bereich der anderen Organproteasomen und nicht darüber.

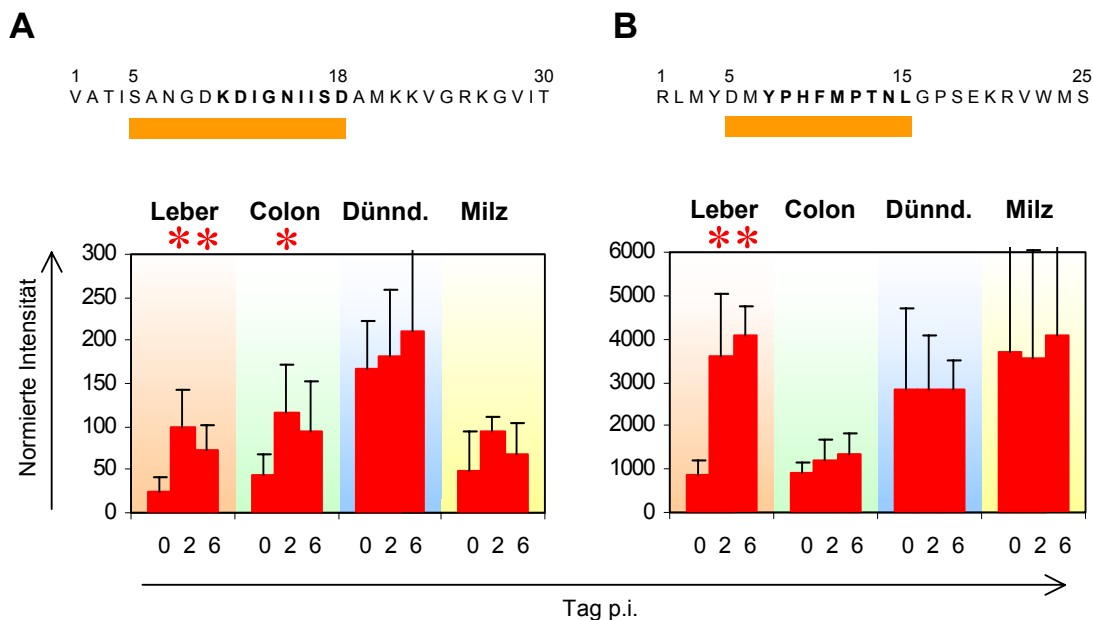


Abb. 23: In vitro Generierung eines (Hsp60)Precursors und eines (pp89)Precursors durch Gewebeproteasomen der Wildtypmäuse. (A) (Hsp60)Precursor 5-18. (B) (pp89)Precursor 5-15. In den oberen Teilen der Abbildung sind das Hsp60- und das pp89-Substrates dargestellt; die Epitopsequenzen sind fettgedruckt; die Precursorsequenzen sind durch orange Balken markiert. Darunter werden die normierten und gemittelten Intensitäten nach 2 h Verdauzeit gezeigt. Sterne (*) kennzeichnen statistische signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bezogen auf Ansätze mit Tag 0 Proteasomen. Dünnd. – Dünndarmproteasomen.

In den I-Tieren kam es durch die Infektion weder bei den Milzproteasomen, noch bei den Dünndarm- oder Colonproteasomen zu signifikanten Unterschieden in der Prozessierung der Hsp60- und pp89-Substrate (nicht gezeigt), was den Resultaten mit LLO-Substrat entsprach. Die Leberproteasomen der I-Tiere hingegen zeigten eine leicht erhöhte Precursorbildung, die aber immer noch deutlich unter der Zunahme blieb, welche bei den Leberproteasomen aus den Wildtypmäusen und den T-Tieren zu verzeichnen war (nicht gezeigt). Sämtliche aus den T-Tieren isolierten Proteasomen verhielten sich bei der Degradation des Hsp60- und des pp89-Substrates ähnlich den Proteasomen aus den Wildtyptieren, und auch dies bestätigte die

durch LLO-Substrat gewonnenen Ergebnisse. Es kann also zusammengefasst werden, dass sich die durch die Infektion ausgelöste Funktionsänderung der isolierten Organproteasomen auf die drei verschiedenen Peptidsubstrate weitgehend in gleicher Weise auswirkte.

3.3 Struktur der aus den Geweben isolierten Proteasomen

20S Proteasomen existieren in zwei Grundformen: den konstitutiven 20S Proteasomen und den 20S Immunoproteasomen. Letztere enthalten anstelle der proteolytisch aktiven Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ die ebenfalls aktiven Immuno-Untereinheiten $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$, welche in Zellkulturexperimenten durch $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ induziert werden können. Im folgenden Kapitel wird dargestellt, ob und in welcher Form die *L. monocytogenes* Infektion einen ähnlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Untereinheiten in Gewebeproteasomen ausübt und ob die Struktur die beobachteten funktionellen Unterschiede begründen kann.

3.3.1 Gewebehomogenate im Westernblot

In Vorversuchen zu der proteasomalen Zusammensetzung wurden die Gewebehomogenate der infizierten Mäuse im Westernblot auf das Vorhandensein der Immuno-Untereinheiten getestet. **Abb. 24A** zeigt die Ergebnisse für die Immuno-Untereinheit $i\beta 2$ in den Homogenaten der Leber und des Dünndarms aus den Wildtypmäusen. In den Leberhomogenaten nahmen unreifes $i\beta 2$ mit Propeptid (pro- $i\beta 2$) und maturiertes $i\beta 2$ nach der Infektion stark zu und sanken nach der überstandenen Listeriose am Tag 27 p.i. wieder auf das Ausgangsniveau. Im Gegensatz dazu stieg in den Dünndarmhomogenaten der bereits schon erhöhte Level von $i\beta 2$ nur geringfügig an und blieb bis zum Tag 27 p.i. konstant. Der Nachweis der Immuno-Untereinheiten $i\beta 1$ und $i\beta 5$ ergab ebenfalls entsprechende Ergebnisse im Westernblot. Zusammen war dies als ein erster Hinweis auf eine organspezifische Proteasomenregulation nach einer *L. monocytogenes* Infektion zu werten. Bei den I-Tieren war weder in den Leber- noch in den Dünndarmhomogenaten eine vergleichbar starke $i\beta 2$ -Zunahme wie in den Leberhomogenaten der Wildtypmäuse zu verzeichnen (**Abb. 24B**). In den T-Tieren stieg $i\beta 2$ jedoch in beiden Organen deutlich an (**Abb. 24C**). Auch diese Ergebnisse ließen sich in Westernblots für die anderen Immuno-Untereinheiten bestätigen. Da für die Versuche Gewebehomogenate verwendet wurden, erfassten die Westernblots die Expression der Proteine in den Organen, unterschieden aber nicht zwischen den freien und den in funktionsfähige Proteasomen eingebauten Immuno-Untereinheiten. Zu diesem Zweck mussten die 20S Proteasomen aus den Homogenaten isoliert werden.

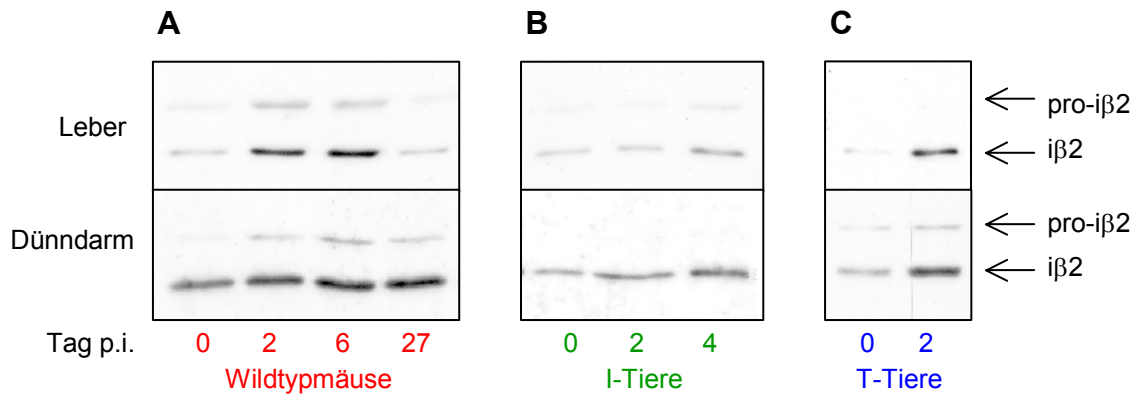


Abb. 24: Detektion der Immuno-Untereinheit iβ2 in Organhomogenaten. 200μg Gesamtprotein aus Leber- und Dünndarmhomogenaten verschiedener Tage nach der Infektion wurde in der SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem Antikörper gegen iβ2 inkubiert. (A) Wildtypmäuse. (B) I-Tiere. (C) T-Tiere. Pfeile kennzeichnen reifes iβ2 und unreifes iβ2 (pro-iβ2).

3.3.2 Zusammensetzung der aus Geweben isolierten 20S Proteasomen

3.3.2.1 Die Zusammensetzung der Proteasomen aus den Geweben der Wildtypmäuse

Um verfolgen zu können, welche Untereinheiten in die Proteasomen eingebaut worden waren, wurden die 20S Proteasomen aus den Geweben isoliert, die Untereinheiten in 2D-Gelen aufgetrennt und mittels MALDI-TOF identifiziert. Die Coomassie-gefärbten Gele wurden eingescannt und die Bilder unbearbeitet densitometrisch ausgewertet. Da die Coomassie-Färbung und -Entfärbung auf einem großen Gel nicht vollständig homogen war, wurde die von den Spots abzuziehende Hintergrundfärbung für jeden Spot separat in dessen unmittelbarer Nähe definiert. Für die Quantifizierung der Immunoproteasomen in den jeweiligen Proteasomenpräparationen wurde folgende Methodik eingeführt: Zuerst wurde in jedem Gel für jedes proteolytisch aktive Untereinheiten-Paar, bestehend aus der konstitutiven und der korrespondierenden Immuno-Untereinheit, die Intensität der Färbung beider Spots zusammen auf 100% gesetzt. Dann wurde der prozentuale Anteil der Immuno-Untereinheit an der Gesamtintensität des jeweiligen Paares bestimmt. Die prozentualen Anteile aller drei Immuno-Untereinheiten in den drei Wiederholungsversuchen wurden gemittelt und dieser Mittelwert als der prozentuale Anteil der Immunoproteasomen in der Proteasomenpräparation dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Präparationen aus den Organen der verschiedenen Tage nach der Infektion wurden durch Anwendung des einseitigen heteroskedastischen t-Testes (Welch-Test) ermittelt (siehe auch 3.2.3).

Abb. 25A zeigt die Zusammensetzung der Leberproteasomen aus Wildtypmäusen in repräsentativen 2D-Gelen. Die Immuno-Untereinheit $i\beta 1$ stieg nach der Infektion deutlich an, während die entsprechende konstitutive Untereinheit $\beta 1$ abnahm; ein analoger Austausch konnte bei dem Paar $i\beta 2/\beta 2$ beobachtet werden. $i\beta 5$ war am Tag 0 schon in geringem Maß in die 20S Proteasomen eingebaut, jedoch reduzierte sich der Anteil der konstitutiven Untereinheit $\beta 5$ in den isolierten Proteasomen bis zum Tag 6 p.i.. Die densitometrische Auswertung ergab in den Lebern der Wildtypiere jeweils signifikante Zunahmen der Immunoproteasomen von ca. 20% am Tag 0 bis zu ca. 60% am Tag 6 p.i. (**Abb. 25B**).

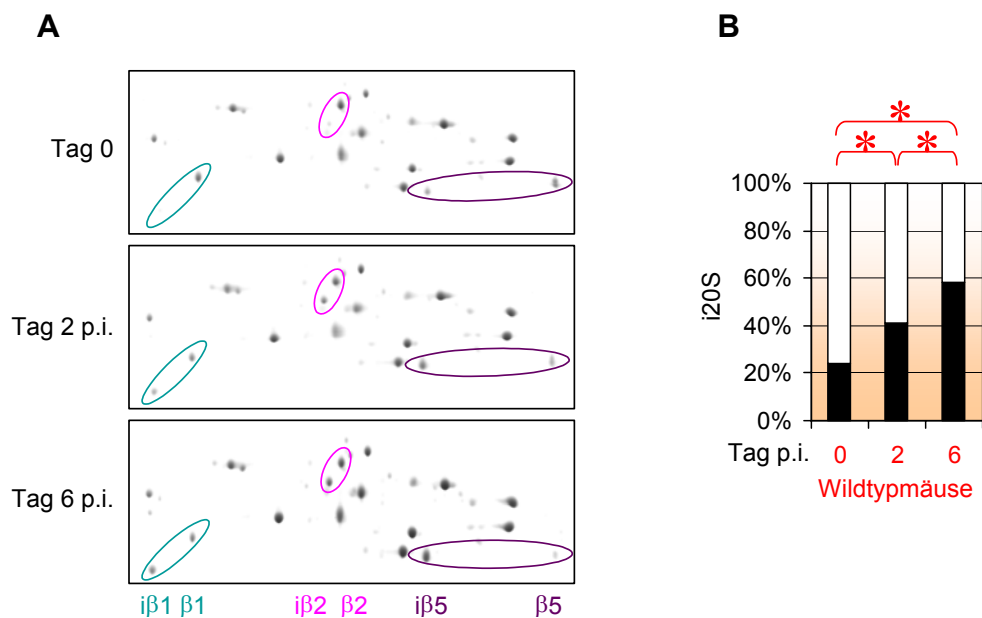


Abb. 25: 2D-Gelelektrophorese der Leberproteasomen aus Wildtypmäusen. (A) Repräsentative Coomassiegefärbte hochauflösende 2D-Gele der an verschiedenen Tagen nach der Infektion aus Leber isolierten 20S Proteasomen. Kreise markieren Paare aus der konstitutiven und der jeweiligen Immuno-Untereinheit: türkis – $i\beta 1/\beta 1$ -Paar; rosa – $i\beta 2/\beta 2$ -Paar; violett – $i\beta 5/\beta 5$ -Paar. (B) Densitometrische Auswertung der in (A) gezeigten Gele zusammen mit den Wiederholungsgelen. Es ist der prozentuale Anteil der Immunoproteasomen (i20S) an der Proteasomenisolation angegeben. Klammern und Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Die aus Dünndarm isolierten Proteasomen der Wildtypiere wurden ebenfalls einer Auftrennung im 2D-Gel unterzogen. Wie in **Abb. 26A** ersichtlich, waren die drei aktiven Immuno-Untereinheiten bereits am Tag 0 in die Proteasomen integriert. Die Infektion hatte interessanterweise keinen Einfluss auf die proteasomale Zusammensetzung, da der Anteil der Immunoproteasomen in den jeweiligen Isolationen aus dem Dünndarm konstant bei ca. 60% blieb (**Abb. 26B**). Es wurde wiederholt beobachtet, dass das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt von $i\beta 2$ und $\beta 2$ in Dünndarmproteasomen von denen der übrigen

Gewebe-proteasomen abweichen (Kuckelkorn et al., 2002); derzeit wird als Ursache hierfür die Möglichkeit des gewebespezifischen Splicing untersucht (Dr. Ulrike Kuckelkorn, persönliche Mitteilung).

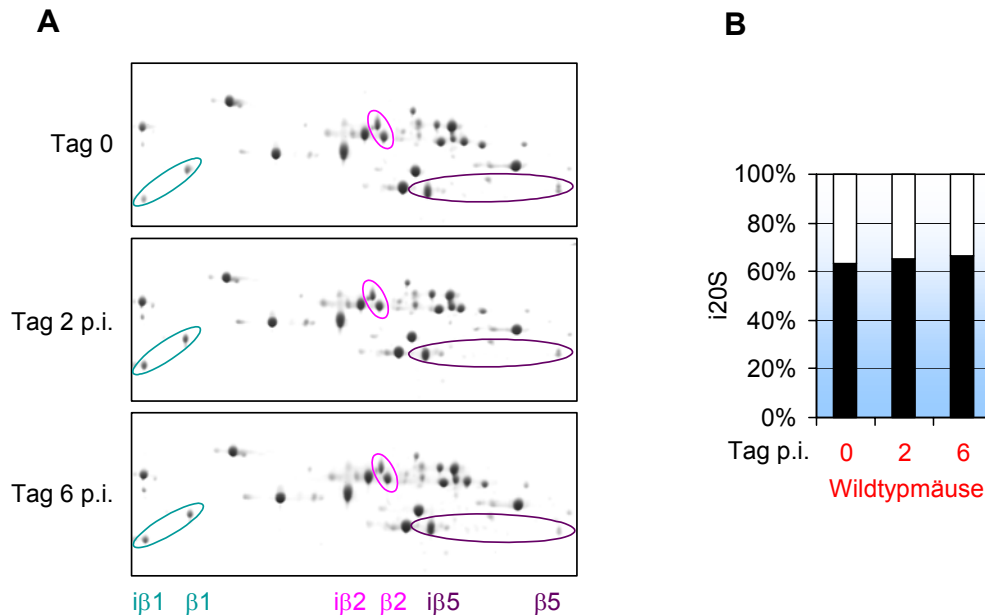


Abb. 26: 2D-Gelelektrophorese der Dünndarmproteasomen aus Wildtypmäusen. (A) Repräsentative Coomassie-gefärbte hochauflösende 2D-Gele der an verschiedenen Tagen nach der Infektion aus Dünndarm isolierten 20S Proteasomen. Kreise markieren die Paare aus der konstitutiven und der jeweiligen Immuno-Untereinheit: türkis – iβ1/β1-Paar; rosa – iβ2/β2-Paar; violett – iβ5/β5-Paar. (B) Densitometrische Auswertung der in (A) gezeigten Gele zusammen mit den Wiederholungsgelen. Es ist der prozentuale Anteil der Immunoproteasomen (i20S) an der Proteasomenisolation angegeben. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zu verzeichnen.

Für die Auftrennung im hochauflösenden 2D-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung wurden 80 µg Proteasom eingesetzt. Da diese Proteasomenmenge aus kleinen Organen wie der Milz und dem Colon nicht reproduzierbar isoliert werden konnte, wurde bei den genannten Organen auf eine umfassende Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese verzichtet. Stattdessen wurden die isolierten Proteasomen mehrfach in der eindimensionalen SDS-PAGE getrennt und Westernblotanalysen durchgeführt. Die Proteasomen aus dem Lymphorgan Milz enthielten in uninfizierten Wildtypmäusen schon einen hohen Anteil an Immuno-Untereinheiten im Vergleich zu den Leberproteasomen (**Abb. 27A**). Analog dazu waren nur sehr geringe Mengen der konstitutiven Untereinheiten in die 20S Proteasomen der Milz integriert (**Abb. 27B**). Dies änderte sich nicht nach der *L. monocytogenes* Infektion und entsprach somit der Zusammensetzung der Proteasomen aus dem anderen untersuchten lymphatischen Organ, den Dünndarmproteasomen.

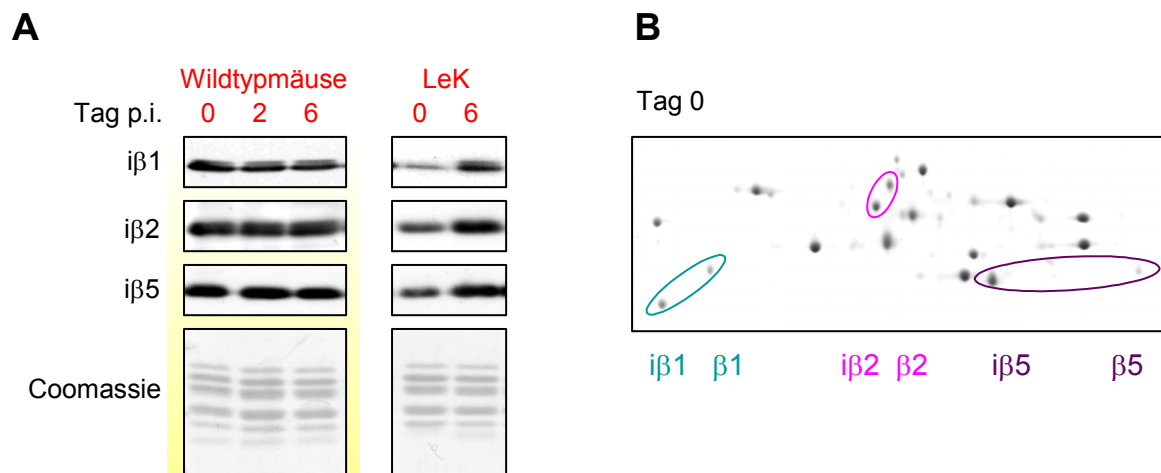


Abb. 27: Westernblotanalyse und 2D-Gelelektrophorese der Milzproteasomen aus Wildtypmäusen. (A) Repräsentative Westernblots gegen die Immuno-Untereinheiten. Zum Vergleich sind Westernblots gegen Leberproteasomen vom Tag 0 und Tag 6 p.i. der Wildtypmäuse dargestellt (LeK). Die Coomassie-gefärbten Membranen demonstrieren, dass gleiche Proteasomenmengen eingesetzt wurden. (B) 2D-Gel der Milzproteasomen, die am Tag 0 aus Wildtypmäusen isoliert wurden. Kreise markieren die Paare aus der konstitutiven und der jeweiligen Immuno-Untereinheit: türkis – iβ1/β1-Paar; rosa – iβ2/β2-Paar; violett – iβ5/β5-Paar.

Der Colon kann als nicht-lymphatisches Organ angesehen werden, da er keine Peyerschen Plaques aufweist. In den Wildtyptieren wurde der Colon im Gegensatz zu Leber und Milz nach der Infektion nicht von *L. monocytogenes* befallen (3.1). Ab Tag 2 p.i. war jedoch im Westernblot eine verstärkte Inkorporation von Immuno-Untereinheiten zu erkennen, die mit der in die Leberproteasomen zu vergleichen war (Abb. 28, vergl. Abb. 25). In Übereinstimmung damit nahmen die konstitutiven Untereinheiten ab. Die Immuno-Untereinheit iβ5 war zwar schon am Tag 0 in die Proteasomen integriert, doch nach Bewältigung der Listeriose am Tag 27 p.i. war der Anteil stark zurückgegangen (Abb. 28). Auffällig war auch die Abnahme der entsprechenden konstitutiven Untereinheit β5 erst am Tag 6 p.i.. Dies entsprach aber der Entwicklung, welche in den 2D-Gelen der Leberproteasomen zu sehen war, da auch dort der deutlichste Rückgang von β5 erst zwischen Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i. zu verzeichnen war (vergl. Abb. 25). Die Struktur der Proteasomen des nicht-lymphatischen, nicht-infizierten Colons änderte sich nach der Infektion analog der Struktur der Proteasomen aus der nicht-lymphatischen, aber infizierten Leber. Eine Schlussfolgerung könnte daher sein, dass *L. monocytogenes* keinen direkten Einfluss auf die Induktion der Immuno-Untereinheiten ausübte, sondern dass die Expression und der Einbau der Immuno-Untereinheiten – vielleicht sogar im gesamten Körper – indirekt vermittelt wurden.

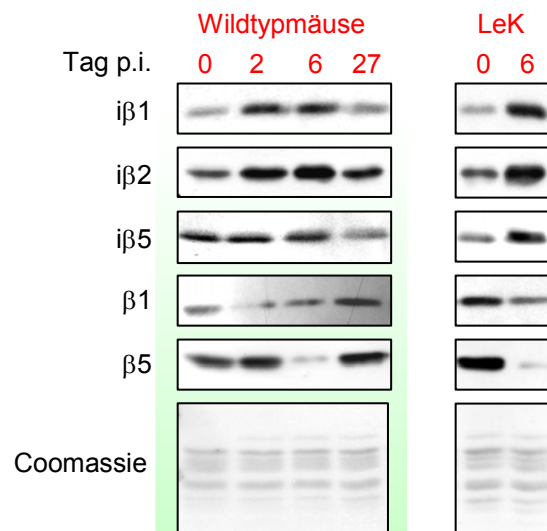


Abb. 28: Westernblotanalyse der Colonproteasomen aus Wildtypmäusen. Es sind repräsentative Westernblots gegen die Immuno- und konstitutiven Untereinheiten isolierter 20S Proteasomen gezeigt. Zum Vergleich sind Westernblots gegen Leberproteasomen von Tag 0 und Tag 6 p.i. der Wildtypmäuse dargestellt (LeK). Die Coomassie-gefärbten Membranen demonstrieren, dass gleiche Proteasomenmengen eingesetzt wurden.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass nach der *L. monocytogenes* Infektion eine Induktion der Immuno-Untereinheiten in den untersuchten nicht-lymphatischen Organen erfolgte. Eine durch die Infektion verursachte Spotverschiebung der α - oder der anderen β -Untereinheiten in den hochauflösenden 2D-Gelen konnte nicht reproduzierbar festgestellt werden. Die lymphatischen Organe enthielten von Tag 0 an mehr Immunoproteasomen, deren Anteil durch die Infektion aber nicht weiter gesteigert werden konnte. Somit ist die Proteasomenpopulation nicht nur im Körper lokal verschieden, sondern kann sich auch innerhalb eines Organs temporär ändern.

3.3.2.2 Die Zusammensetzung der Proteasomen aus den Geweben der Rezeptor-defizienten Mäuse

TNF α und IFN γ sind proinflammatorische Cytokine, deren Aufgabe es ist, Entzündungsstimuli zu vermitteln. Aus Zellkulturexperimenten gewonnene Daten sprechen diesen beiden Cytokinen eine Rolle bei der Induktion der Immuno-Untereinheiten zu (Hallermalm et al., 2001; Schroder et al., 2004). Ob dies die *in vivo* Situation widerspiegelt, sollte durch die Analysen von Cytokinrezeptor-defizienten Mäusen geklärt werden. Die densitometrische Auswertung der 2D-Gele von Leberproteasomen ergab, dass nur in den T-Tieren eine signifikante Zunahme der Immunoproteasomen zu beobachten war. Sie betrug

wie bei den Wildtypmäusen ca. 20% (**Abb. 29A**), wohingegen der vermeintliche Anstieg zwischen Tag 0 und Tag 4 p.i. bei den I-Tieren mit $p \geq 0,17$ als eindeutig nicht signifikant einzustufen war. Es konnte also keine deutliche Zunahme der Immunoproteasomen in den mit *L. monocytogenes* infizierten I-Tiere beobachtet werden. Bei den Dünndarmproteasomen war ebenfalls eine Übereinstimmung zwischen Wildtyp- und T-Tieren festzustellen, da beide von Tag 0 an schon ca. 60% Immunoproteasomen enthielten (**Abb. 29B**). Die I-Tiere wiesen im Dünndarm zwar mehr Immunoproteasomen auf als zu dem jeweils selben Zeitpunkt in ihrer Leber. Jedoch lag der Anteil der Immunoproteasomen im Dünndarm der I-Tiere mit ca. 40% deutlich unter dem ca. 60%igen Immunoproteasomenanteil im Dünndarm der Wildtypmäuse und T-Tiere. Den drei Tiermodellen gemeinsam war, dass die Infektion keine signifikante Induktion der Immuno-Untereinheiten im Dünndarm bewirken konnte.

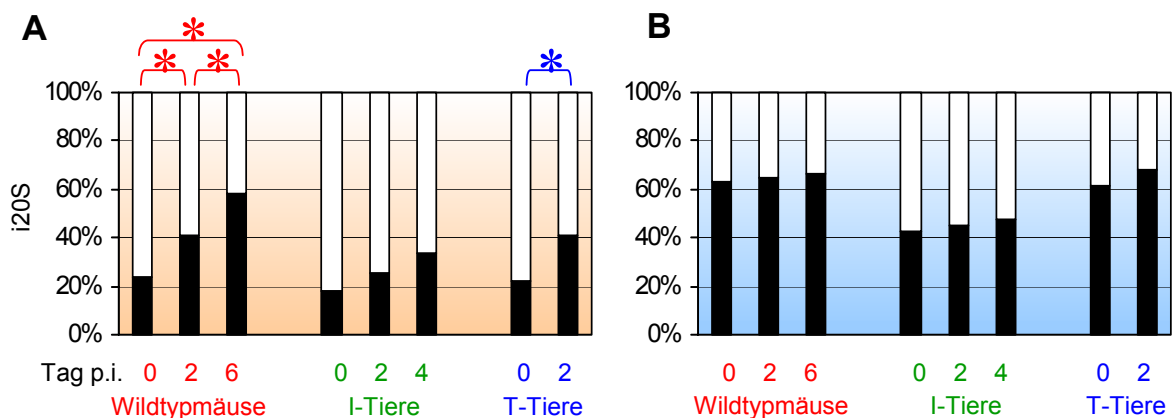


Abb. 29: Übersicht des Anteils der Immunoproteasomen in den Präparationen aus Leber und Dünndarm. Densitometrische Auswertung der drei Immuno-Untereinheiten von je zwei bis drei 2D-Gelen. Es ist der prozentuale Anteil der Immunoproteasomen (i20S) angegeben. Zum Vergleich ist die Auswertung der Proteasomen aus den Wildtypmäusen noch einmal gezeigt. (A) Leberproteasomen. (B) Dünndarmproteasomen. Klammern und Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Ähnlich den Resultaten für Leberproteasomen enthielten die Colonproteasomen der T-Tiere am Tag 2 p.i. in der Westernblotanalyse sichtbar mehr Immuno-Untereinheiten als am Tag 0, wobei in den I-Tieren ein Anstieg dieser Untereinheiten nicht zu verzeichnen war (**Abb. 30A, B**). Die Ergebnisse der Westernblots für Milzproteasomen zeigten, dass sich in diesem bei den I- und T-Tieren sehr stark infizierten Organ der Anteil der Immuno-Untereinheiten nicht weiter erhöhte (**Abb. 30C**).

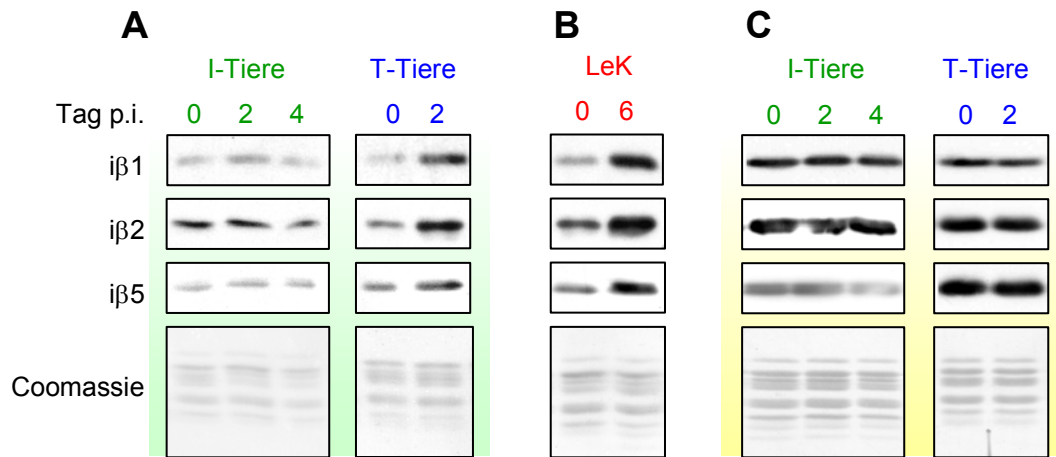


Abb. 30: Westernblotanalyse der Colon- und Milzproteasomen aus Cytokinrezeptor-defizienten Mäusen. Es sind repräsentative Westernblots gegen die Immuno-Untereinheiten isolierter 20S Proteasomen der I-Tiere (grüne Schrift) und T-Tiere (blaue Schrift) gezeigt. Die Coomassie-gefärbten Membranen demonstrieren, dass gleiche Proteasomenmengen eingesetzt wurden. (A) Colonproteasomen. (B) Leberproteasomen von Tag 0 und Tag 6 p.i. der Wildtypiere als Kontrolle (LeK). (C) Milzproteasomen.

Obwohl die T-Tiere die Infektion nicht bekämpfen konnten, wiesen sie bei den Immuno-proteasomen keinerlei Defizite auf: In Leber und Colon entsprach die Induktion der Immuno-Untereinheiten der in den Wildtypmäusen, und auch Dünndarm und Milz besaßen ähnlich hohe Ausgangsniveaus an Immuno-Untereinheiten. Daraus folgte, dass $\text{TNF}\alpha$ keinen dominanten Einfluss auf die proteasomale Expression vor und nach der Infektion ausübte. Im Gegensatz dazu besaßen die I-Tiere in Dünndarm und Milz generell weniger Immunoproteasomen als in den Wildtyp- oder T-Tieren und reagierten nach Besiedlung durch *L. monocytogenes* weder in der Leber noch im Colon mit der Induktion der Immuno-Untereinheiten. Dies stützt die oben geäußerte Hypothese, dass die Erreger selbst keinen direkten Einfluss auf die Regulation der proteasomalen Untereinheiten ausüben, sondern diese *in vivo* von einem weiteren Faktor abhängig ist, nämlich $\text{INF}\gamma$ und nicht $\text{TNF}\alpha$.

3.4 Struktur- und Funktionsanalyse der Proteasomen aus ausgewählten Gewebezelltypen

Organe bestehen aus unterschiedlichen Zelltypen mit verschiedenen Funktionen. Ist ein Gewebe infiziert, wandern zusätzlich Zellen des Immunsystems in die Gewebe ein. Die Zunahme der Immunoproteasomen und der Peptidgenerierung in den Präparationen aus der Leber der Wildtyp- und T-Tiere könnte demnach auf der Ansammlung von Monocyten am Infektionsherd beruhen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Hepatocyten am Tag 0 und Tag 2 p.i. von den restlichen Zellen der Leber aus Wildtypmäusen separiert und zur

Isolation von 20S Proteasomen verwendet. Diese isolierten Proteasomen wurden sowohl in den *in vitro* Prozessierungsexperimenten eingesetzt als auch in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Aus Hepatocyten isolierte Proteasomen vom Tag 2 p.i. generierten deutlich mehr Epitop und Precursor als die Hepatocytenproteasomen vom Tag 0 (Abb. 31A). Abb. 31B zeigt, dass die Immuno-Untereinheiten vom Tag 0 zu Tag 2 p.i. ebenfalls zunahmen. Damit entsprachen diese Resultate den zuvor dargestellten Ergebnissen mit Proteasomen, die aus der gesamten Leber isoliert worden waren (vergl. Abb. 18 und Abb. 25).

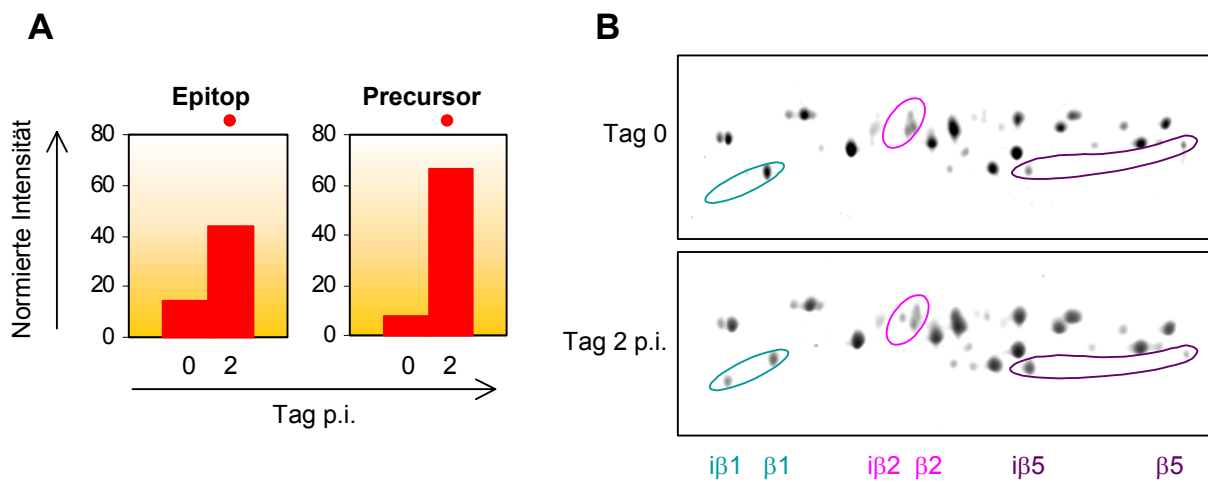


Abb. 31: Funktionelle und strukturelle Analyse der Hepatocytenproteasomen. (A) Es werden die normierten Intensitäten nach einer repräsentativen Prozessierung des LLO-Substrates mit 4 h Verdauzeit gezeigt. Punkte (•) markieren reproduzierbare Fragmentzunahmen bezogen auf Ansätze mit Tag 0 Proteasomen. (B) Coomassie-gefärbte 2D-Gele der aus Hepatocyten präparierten Proteasomen. Kreise markieren die Paare aus der konstitutiven und der jeweiligen Immuno-Untereinheit: türkis – iβ1/β1-Paar; rosa – iβ2/β2-Paar; violett – iβ5/β5-Paar.

Anschließend wurde die Expression der Immuno-Untereinheiten in den verschiedenen Gewebezellen und eingewanderten Immunzellen auch mithilfe der Immunofluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Gewebeschnitte aus Leber und Colon vor der Infektion und am Tag 2 p.i. wurden mit Antikörpern gegen die Immuno-Untereinheit iβ2 und gegen den Makrophagen-Marker F4/80 gefärbt. Die Auswertung der Übersichtsaufnahmen ergab, dass in den nicht-lymphatischen Zellen die Bildung von Immunoproteasomen durch die *L. monocytogenes* Infektion induziert wurde: In der Leber stieg die Färbung der Immuno-Untereinheit in den Hepatocyten besonders sichtbar in den Zellkernen an (Abb. 32A), und auch die Epithelzellen des Colon entlang der Lieberkünn Krypten reagierten nach der Infektion mit einer starken Expression der Immuno-Untereinheit (Abb. 32B). Wie sich aus der Überlagerung der beiden Antikörperfärbungen ergab, wurde iβ2 ebenfalls in den Makrophagen exprimiert, die nach der Infektion im Colon in die unterhalb der Epithelzellen gelegene Lamina Propria eingewandert waren. Die im Gewebe residierenden Makrophagen

der Leber, die Kupfferschen Zellen, zeigten keine erhöhte Induktion der Immuno-Untereinheit. Entsprechende Färbungen wurden in denselben Geweben bei Verwendung der Antikörper gegen die anderen beiden Immuno-Untereinheiten iβ1 und iβ5 erzielt (nicht gezeigt).

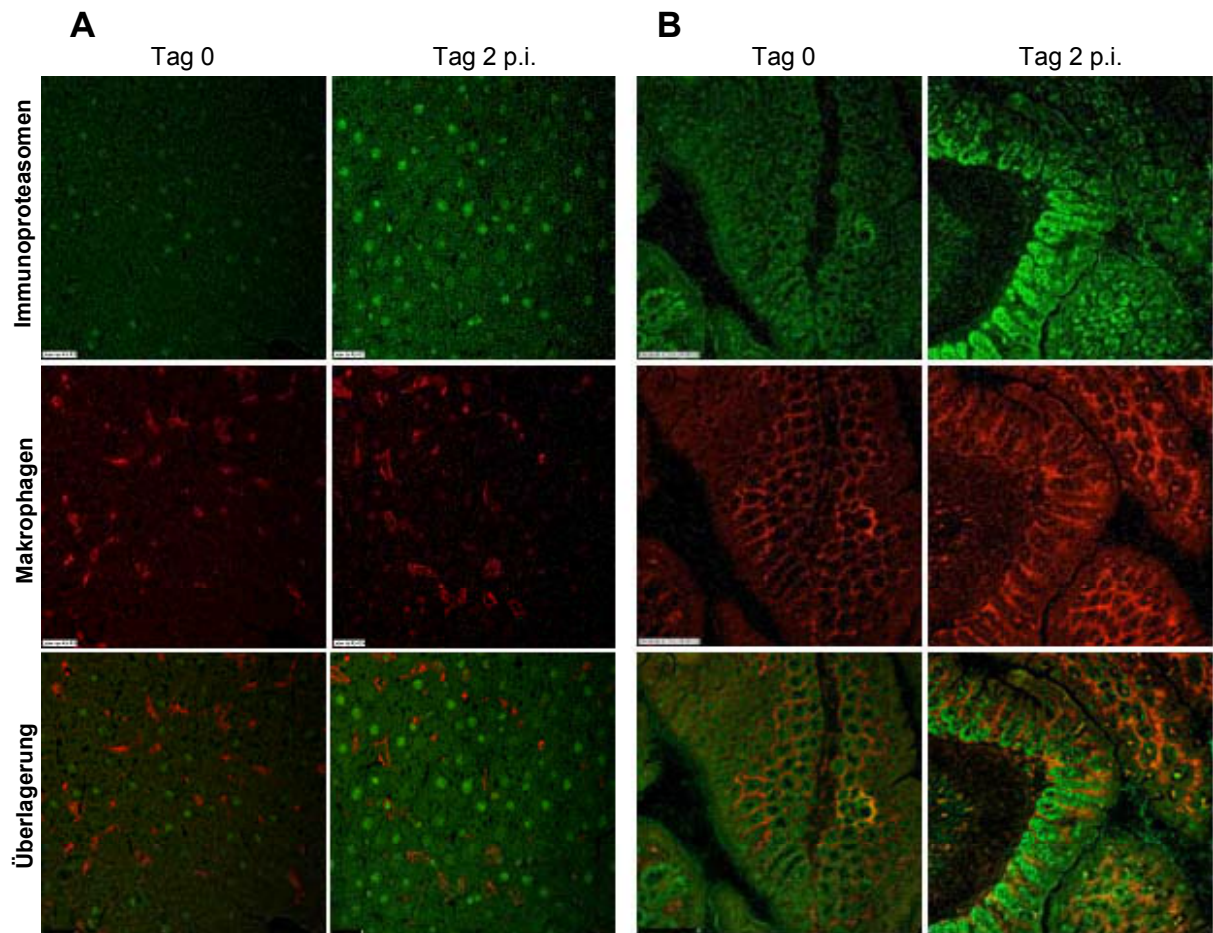


Abb. 32: Expression der Immunoproteasomen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Zellen. Es werden Übersichtsaufnahmen der Immunofluoreszenz-Analysen von (A) Leberschnitten und (B) Colonschnitten vom Tag 0 und Tag 2 nach der *L. monocytogenes* Infektion gezeigt. Die Immunoproteasomen wurden mit einem Antikörper gegen iβ2 gefärbt (grün). Makrophagen wurden durch Färbung des Markerproteins F4/80 nachgewiesen (rot). Die Überlagerung der beiden Färbungen ist orange dargestellt. Die Schnitte der beiden Organe zeigen am Tag 2 p.i. eine deutlich stärkere Expression der Immunoproteasomen als am Tag 0. (Vergrößerung ca. 100x)

3.5 Funktionelle Unterschiede zwischen konstitutiven und Immunoproteasomen

Die genauere Charakterisierung des Prozessierungsverhaltens von konstitutiven und Immunoproteasomen erforderte eine detaillierte Auswertung der Prozessierungsexperimente. Entsprechend der in 3.3.2.1 gezeigten proteasomalen Zusammensetzungen werden in diesem Kapitel die Leberproteasomen, die vor der *L. monocytogenes* Infektion aus den Wildtypmäusen isoliert wurden, zur Vereinfachung als konstitutive Proteasomen bezeichnet. Dementsprechend werden die Leberproteasomen vom Tag 6 p.i. sowie die Dünndarmproteasomen nur Immunoproteasomen genannt.

Die eingesetzten Peptidsubstrate wurden in den *in vitro* Prozessierungsexperimenten von den Immunoproteasomen schneller degradiert als von den konstitutiven Proteasomen. **Abb. 33** zeigt dies am Beispiel des LLO-Substrates im Verdau mit Leberproteasomen, die in Anlehnung an die Ergebnisse aus (3.3.2.2) in konstitutive und Immunoproteasomen eingeteilt wurden. Wurde die übriggebliebene Substratmenge nach einem 2 h Verdau mit konstitutiven Proteasomen auf 100% gesetzt, waren in den Ansätzen mit Immunoproteasomen nach derselben Verdauzeit nur noch weniger als 30% Substrat vorhanden.

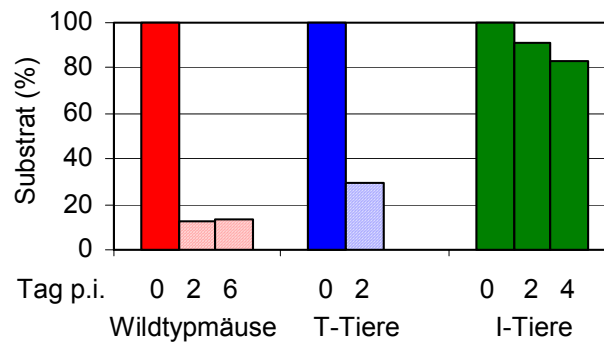


Abb. 33: Beschleunigter Substratabbau durch Immunoproteasomen. Nach 2 h Verdauzeit des LLO-Substrates wurde die Substratmenge aus den Ansätzen mit den Tag 0 Leberproteasomen der Wildtypmäuse, I- und T-Tiere auf je 100% gesetzt. Hellere Flächen kennzeichnen die Prozessierungsansätze mit Immunoproteasomen.

Da Immunoproteasomen die Substrate schneller umsetzten, kann geschlussfolgert werden, dass die Produkte in diesen Prozessierungsansätzen schneller generiert wurden. Daraus ergab sich die Frage, ob die in 3.2.4 beobachteten Unterschiede ausschließlich auf die Geschwindigkeit der Immunoproteasomen zurückzuführen sind. Um diese Frage zu klären wurden sogenannte Antitope in die Auswertung miteinbezogen. Antitope sind Fragmente, die durch einen Schnitt innerhalb der Epitopsequenz entstehen, so dass eine weitere

Prozessierung der Fragmente zu Precursor oder Epitopen nicht mehr möglich ist. Das Antitop 4-12 sowie ein weiteres untersuchtes Antitope (**Abb. 34A** und nicht gezeigt; vergl. **Abb. 14**) wurden aus dem LLO-Substrat durch die Immunoproteasomen häufiger gebildet als durch die konstitutiven Proteasomen, was der Generierung der immunrelevanten Fragmente entsprach (**Abb. 34B**; vergl. **Abb. 18**).

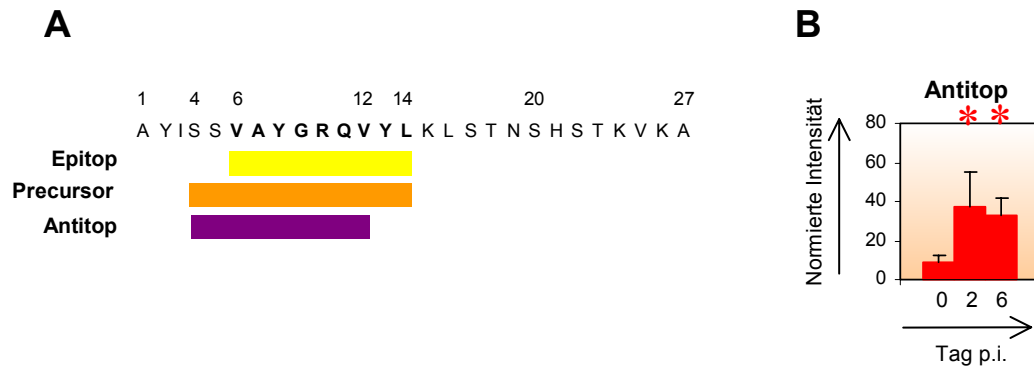


Abb. 34: Auswertung des Antitopes 4-12. (A) Schnittkarte des LLO-Substrates zur Veranschaulichung der Lage des Antitopes 4-12. (B) Normierte und gemittelte Intensitäten des Antitopes 4-12 nach 2 h Verdauzeit mit Leberproteasomen der Wildtypiere. Sterne (*) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bezogen auf den Ansatz mit Tag 0 Proteasomen (konstitutive Proteasomen).

Um Unterschiede in den Zunahmen quantitativ erfassen zu können, sollte geklärt werden, ob die Intensitäten linear zu den Fragmentmengen stiegen und somit quantitative Aussagen möglich wurden. Bei der Erstellung von Eichgeraden musste in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass sich die Peptide in der massenspektrometrischen Messung und auch in der vorgeschalteten HPLC gegenseitig beeinflussten (Tang et al., 2004). Demnach waren die detektierten Intensitäten auch von der Zusammensetzung der Probe abhängig. Für den Precursor 4-14, das Antitop 4-12 und die beiden Epitope 6-14 und 7-14 wurden Eichreihen angefertigt, die diese Fragmente in zwölf unterschiedlichen Konzentrations-Zusammensetzungen enthielten, um sich der realen Situation, die einem viele verschiedene Produkte enthaltenden Prozessierungsansatz entspricht, anzunähern.

Die Auswertung ergab, dass die Zunahme der Epitope 6-14 und 7-14 sowie des Precursors mit einer linearen Intensitätszunahme einherging, die unabhängig von der Zusammensetzung der Probe war (**Abb. 35**). Die Intensität des Antitopes hingegen wurde bei 10 pmol und 20 pmol von den Mengen der anderen Fragmente beeinflusst, was durch die große Streuung der Intensitäten deutlich wurde. Zuvor erstellte Daten und ein bei den Eichmessungen mitgeführter proteasomaler LLO-Prozessierungsansatz zeigten, dass die normalerweise gemessenen Intensitäten durch Fragmentmengen zwischen 1 pmol und 5 pmol erreicht wurden. Da in diesem Bereich auch die Streuung des Antitopes gering war, konnte die Generierung dieser Fragmente in den Prozessierungsexperimenten direkt miteinander verglichen werden.

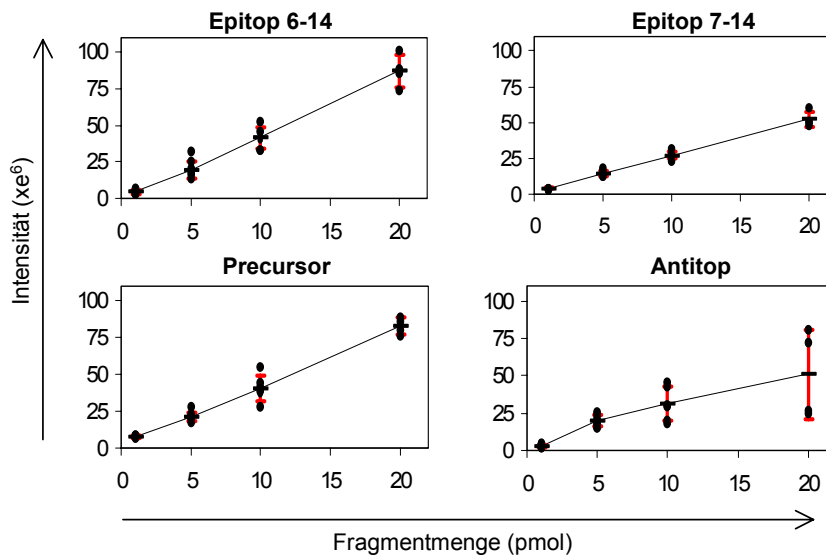


Abb. 35: Eichgeraden für ausgewählte Fragmente in verschiedenen Konzentrations-Zusammensetzungen. Die Fragmentmischungen wurden mit gleichen Mengen LLO-Substrat und internem Standard versetzt und mithilfe der HPLC-ESI-Ionenfalle massenspektrometrisch analysiert. Jeder Punkt zeigt die gemessene Intensität bei bestimmter Fragmentmenge pro Probe in einer der insgesamt zwölf doppelt gemessenen Eichlösungen. Die Gerade geht durch die Mittelwerte der Intensitäten für die jeweiligen Fragmentmengen; die Standardabweichungen sind rot eingezeichnet.

Die normierten Intensitäten des Precursors und des Epitopes wurden zu den normierten Intensitäten des Antitopes 4-12 ins Verhältnis gesetzt. Bei den konstitutiven Proteasomen, also den Leberproteasomen der I-Tiere und dem Tag 0 Leberproteasomen der Wildtypmäuse, lag das Verhältnis der Intensitäten bei ungefähr 1 (**Abb. 36**). Im Gegensatz dazu generierten die Immunoproteasomen – Dünndarmproteasomen und Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i. Leberproteasomen der Wildtypmäuse – mindestens das Doppelte an Epitop und Precursor. Obwohl die Immunoproteasomen alle untersuchten Fragmente, demnach auch das Antitop, verstärkt bildeten, konnte also zusätzlich eine Änderung in der Schnittpräferenz zugunsten der immunrelevanten Produkte beobachtet werden.

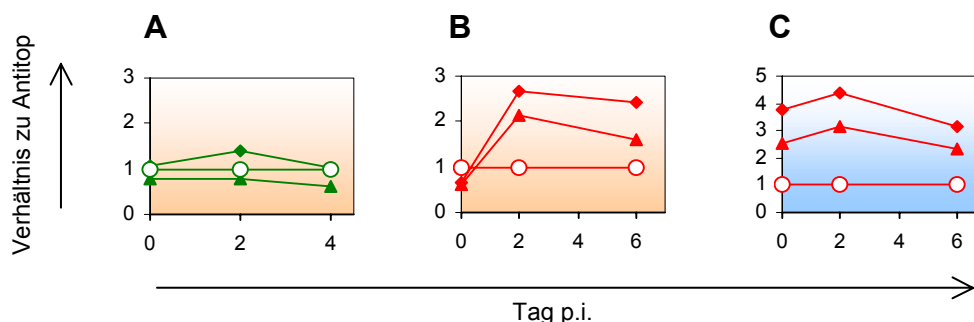


Abb. 36: Änderung der Schnittpräferenz. Das LLO-Substrat wurde durch konstitutive und Immunoproteasomen degradiert und mittels der HPLC-ESI-Ionenfalle massenspektrometrisch analysiert. Normierte Intensitäten der immunrelevanten Fragmente wurden zu den normierten Intensitäten des Antitopes 4-12 ins Verhältnis gesetzt. (A) Leberproteasomen der I-Tiere (konstitutive Proteasomen). (B) Leberproteasomen der Wildtypmäuse (Tag 0: konstitutives Proteasom; Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i.: Immunoproteasomen). (C) Dünndarmproteasomen der Wildtypmäuse (Immunoproteasomen). ♦ – Precursor 4-14; ▲ – Epitop 6-12; o – Antitop 4-12.

Außerdem sollte geklärt werden, ob Immunoproteasomen durch die geänderte Schnittpräferenz zusätzlich in der Lage sind, Spaltungen nach Aminosäuren vorzunehmen, hinter denen konstitutive Proteasomen nicht schneiden. Hierfür wurden insgesamt 16 Prozessierungsansätze mit verschiedenen Inkubationszeiten unter dem Aspekt untersucht, ob jeder Ansatz sämtliche massenspektrometrisch identifizierten Produkte enthielt (vergl. **Abb. 14**). Immunoproteasomen generierten in jedem Ansatz alle Fragmente, die in der vollständige Schnittkarte auftreten; in den Degradationen mit konstitutiven Proteasomen fehlten jedoch immer die Produkte 6-12 und 17-25 (**Abb. 37**). Diese Produkte wurden aber von Immunoproteasomen mit Schnitten gebildet, welche auch von konstitutiven Proteasomen durchgeführt wurden, da verlängerte und angrenzende Fragmente in den Prozessierungsansätzen mit konstitutiven Proteasomen detektierbar waren. Es ließ sich also schlussfolgern, dass beide Proteasomenarten dieselben Schnittstellen nutzten, die Immunoproteasomen aber mehr Fragmente oberhalb des massenspektrometrischen Detektionslimits produzierten.

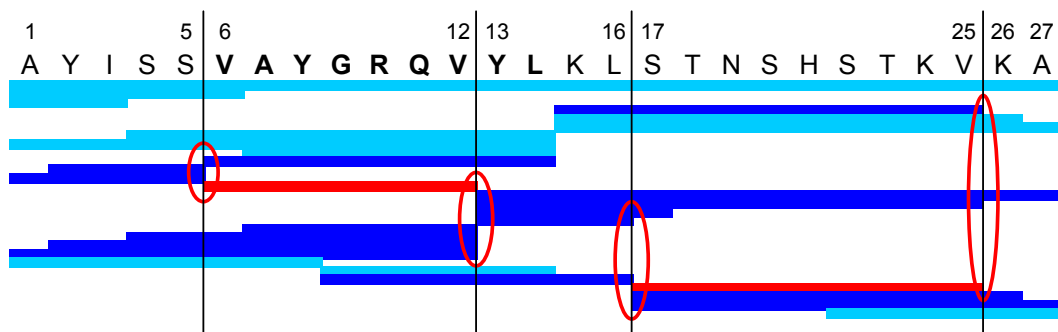


Abb. 37: Fragmentgenerierung durch konstitutive und Immunoproteasomen. Das LLO-Substrat wurde 2 h und 8 h mit konstitutiven oder Immunoproteasomen inkubiert. Sämtliche Fragmente (alle Farben) wurden durch die Immunoproteasomen gebildet. Die rote Balken zeigen die Fragmente 6-12 und 17-25, die nicht von den konstitutiven Proteasomen generiert wurden. Die dunkelblauen Balken symbolisieren die Produkte, die durch die Schnitte entstanden sind, welche auch die Fragmente 6-12 und 17-25 betreffen; diese Schnitte sind rot umrandet. Die hellblauen Balken repräsentieren die Fragmente, deren Schnittstellen nicht mit den Fragmenten 6-12 und 17-25 übereinstimmen.

3.6 Posttranslationale Modifikation der Proteasomen mit O-GlcNAc – Erste Hinweise

Immunoproteasomen können sich strukturell und funktionell weiter unterscheiden. Dies wurde neben der Arbeit von Kuckelkorn *et al.* (Kuckelkorn et al., 2002) auch durch die in 3.2.4.3 durchgeführten Prozessierungsexperimente bestätigt: Obwohl der Colon der Wildtypmäuse am Tag 2 p.i. und Tag 6 p.i. Immunoproteasomen enthielt, war die Generation des (pp89)Precursor 5-15 nicht erhöht – im Gegensatz zu der Produktion dieses Produktes durch die Immunoproteasomen aus den Lebern derselben Tiere (vergl. **Abb. 23B**, **Abb. 25**, **Abb. 28**). Die proteasomale Funktion wird also nicht ausschließlich durch das Vorhandensein der Immuno-Untereinheiten bestimmt. Eine Regulation der proteasomalen Aktivität, die nur das pp89-Substrat aber nicht das LLO- und Hsp60-Substrat betrifft (vergl. **Abb. 19** und **Abb. 23A**), wäre z.B. durch posttranslationale Modifikationen zu erreichen. Bisher wurde nachgewiesen, dass mehrere proteasomale Untereinheiten phosphoryliert vorliegen können, wobei aber keine eindeutige Korrelation zur proteasomalen Aktivität hergestellt werden konnte (Fernandez Murray et al., 2002; Iwafune et al., 2002; Mason et al., 1996). Allerdings führt IFN γ zu einer Dephosphorylierung und Destabilisierung von 26S Proteasomen (Bose et al., 2001; Bose et al., 2004). Ein Antagonist der Phosphorylierung ist die nukleo-cytosolische Glycosylierung mit dem Monosaccharid N-Acetylglucosaminin (GlcNAc), da GlcNAc über den Sauerstoff von Serin- und Threoninresten (O-GlcNAc) an dieselben oder benachbarten Aminosäuren wie die Phosphatgruppe binden kann (Slawson und Hart, 2003). Aus diesem Grund ist interessant zu überprüfen, ob nach der *L. monocytogenes* Infektion, die zu einem Anstieg von IFN γ führt (vergl. **Abb. 9**), auch ein Effekt auf eine möglicherweise vorhandene Modifikation der Proteasomen mit O-GlcNAc zu verzeichnen ist.

In Vorversuchen wurde mit aus der RMA-Zellkulturlinie isolierten 20S Proteasomen untersucht, ob O-GlcNAc an 20S Proteasomen nachweisbar ist. Eine unspezifische Zuckerfärbung über Aufspaltung des Pyranoseringes durch Perjodat und anschließender Streptavidin-Biotin Markierung ergab ein initial positives Ergebnis (nicht gezeigt). Als nächstes wurden das GlcNAc-spezifische Lektin WGA getestet, welches GlcNAc auch in Verbindung mit anderen Zuckern erkennt, sowie zwei Antikörper, die ausschließlich die über Sauerstoff gebundenen Monosaccharide detektieren (**Abb. 38**). Das Lektin und die Antikörper erkannten die meisten proteasomalen Untereinheiten. Da die Lektin- und Antikörperbindungen durch freies GlcNAc konzentrationsabhängig zu inhibieren waren, sprach dies für einen spezifischen Nachweis und bedeutete somit, dass die meisten Untereinheiten mit O-GlcNAc modifiziert vorlagen. Zwei der mit allen drei Detektionsmethoden stark gefärbten Banden konnten massenspektrometrisch als $\alpha 4$ beziehungsweise als $\beta 5/\beta 5$ identifiziert werden.

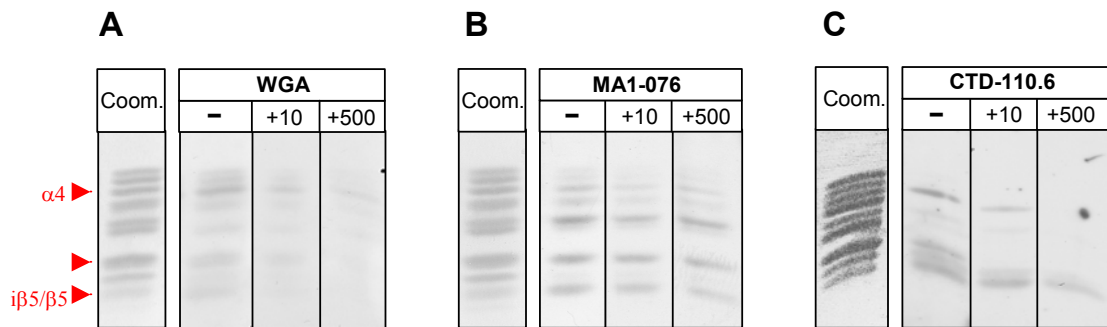


Abb. 38: O-GlcNAc Nachweis an 20S Proteasomen. Aus der Zellkulturlinie RMA isolierte Proteasomen wurde in der Gelelektrophorese nach Schagger/vonJagow getrennt, geblottet und mit Coomassie gefärbt. Zu den Inkubationsansätzen mit Lektin oder Antikörper wurde kein (-), 10 mM (+10) oder 500 mM (+500) freies GlcNAc zugegeben. Die mit allen drei Nachweismethoden detektierten Banden sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet und beschriftet, wenn sie massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. (A) WGA-Lektin; (B) MA1-076 Antikörper; (C) CTD-110.6 Antikörper.

Die Antikörper- und Lektinfärbung der in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und geblotteten RMA-Proteasomen war generell sehr schwach (nicht gezeigt). Um einen sensitiveren Nachweis zu etablieren, wurden in Zellkulturexperimenten radioaktive *in vivo* Markierungen durchgeführt. RMA-Zellen wurden in Glucose-freiem Medium mit ^{14}C -Glucosamin versetzt, welches die Zellen aufnehmen und zu GlcNAc umbauen können. Nach Inkubationszeiten von 1 bis zu 5 h wurden 20S Proteasomen durch Immunopräzipitation angereichert und im SDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt, um zu verhindern, dass möglicherweise in die Aminosäuresynthese eingegangenes ^{14}C -Glucosamin eine Proteinmarkierung verursachte. Wie aus **Abb. 39** ersichtlich ist, war jedoch genau dies der Fall, da die zeitabhängige radioaktive Markierung sich unter nicht-toxischer Cycloheximidzugabe nicht reproduzieren ließ. Die *in vivo* Markierung ist deshalb nicht für den Nachweis von O-GlcNAc Modifikationen geeignet. Als methodische Alternative steht eine noch zu testende radioaktive *in vitro* Markierung zur Verfügung.

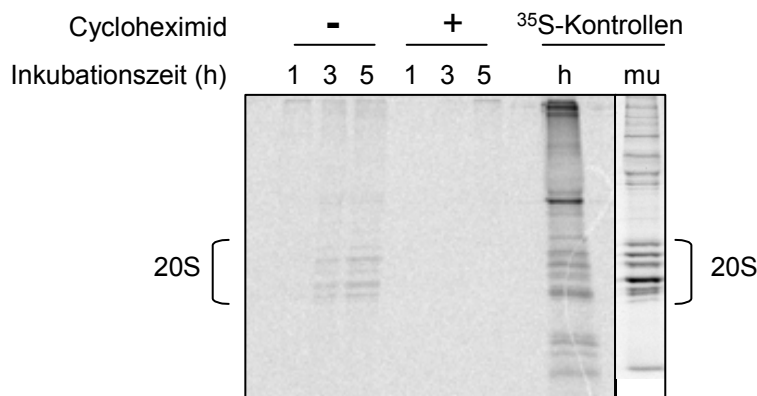


Abb. 39: *In vivo* Markierung mit ^{14}C -Glucosamin. RMA-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten ohne (-) und mit (+) Cycloheximid in ^{14}C -Glucosamin-haltigem Medium inkubiert. Die immunopräzipitierten Proteasomen wurden in der SDS-PAGE getrennt. Als Größenkontrolle wurde ^{35}S -markiertes 20S aus humanen Zellen (h) oder den murinen RMA-Zellen (mu) mitaufgetragen.

Für weitere Experimente mit kultivierten Zellen zur Analyse der posttranslationalen Modifikation mit O-GlcNAc wurde das spezifisch O-GlcNAc von Proteinen abspaltende Enzym N-Acetylglucosaminidase (NAG) kloniert sowie eine gegen NAG gerichtete siRNA entwickelt. Die Transfektion von 500 pmol siNAG in RMA-Zellen führte zu einer spezifischen Abnahme der NAG-Expression und hatte keinen Effekt auf die zur Kontrolle untersuchte Aktin-Expression (**Abb. 40**). Wie erwünscht zeigte die Transfektion mit einer unspezifischen siRNA keinen Effekt. Klonierung und spezifische siRNA sind derzeit auch für die O-GlcNAc-Transferase (OGT) in Bearbeitung.

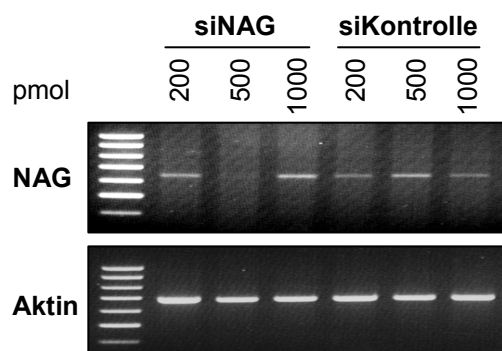


Abb. 40: RT-PCR zur Überprüfung der siRNA-Funktion. RMA-Zellen wurden durch Elektroporation mit 200 pmol, 500 pmol oder 1000 pmol der siRNA gegen NAG (siNAG) oder einer unspezifischen siRNA (siKontrolle) transfiziert. Nach 24 h wurde durch RT-PCR für NAG und Aktin überprüft, ob die Genexpression beeinflusst wurde.

Die exakte Position der Glycosylierung innerhalb eines Proteins lässt sich theoretisch durch massenspektrometrische Untersuchungen bestimmen. Da O-GlcNAc in diesen Analysen jedoch nicht stabil ist, wird momentan eine regulierte beta-Elimination des Zuckers mit anschließender stabiler Substitution etabliert, die in einer definierten Verschiebung des m/z resultiert. Um die Suche so weit wie möglich einzugrenzen, wurden in einigen Untereinheiten Aminosäuren identifiziert, welche für eine Modifizierung in Frage kommen. Hierfür wurden die Primärsequenzen zuerst mithilfe des im Internet verfügbaren Vorhersageprogramms „YinOYang“ für Phosphorylierungs- und O-Glycosylierungsstellen ausgewertet. Als zusätzliche Kriterien wurden Konserviertheit und exponierte Lage auf Oberfläche des Proteasoms festgelegt. Zusätzlich wurden die Rohdaten für die proteasomale Röntgenkristallstrukturaufklärung dahingehend untersucht, ob in der Nähe der ausgewählten Aminosäuren strukturell nicht zu identifizierende Elektronendichten auftraten: Eine regulatorische Modifikation ist nicht unbedingt an allen Proteasomen gleich stark vertreten und würde wegen ihres vereinzelten Vorkommens nur als undefinierte Elektronenwolke in der Strukturaufklärung auffallen (Dr. Michael Groll, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse sind in **Tab. 5** zusammengefasst.

Tab. 5: Potentiell modifizierte Aminosäuren. Die Positionen der Aminosäuren beziehen sich auf die murinen Untereinheiten (UE). „zugänglich“ bedeutet, dass die Aminosäure an der Oberfläche des Proteasoms liegt und für modifizierende Enzyme gut erreichbar ist. „theoretische Modifikationsstellen“ sind mit dem „YinOYang“-Programm ermittelt worden.

UE	Aminosäure	Beschreibung
$\alpha 2$	Y5-T15	gut zugänglich drei theoretische Phosphorylierungsstellen davon eine auch theoretische O-GlcNAc Stelle
	S53, S197, T221	zugänglich, theoretische Phosphorylierungsstelle
	T106, S151	zugänglich, theoretische O-GlcNAc Stellen
$\alpha 3$	S7	zugänglich, theoretische O-GlcNAc Stelle
	T10, T13, S173, T185, S204	zugänglich, theoretische Phosphorylierungsstellen
	S133	zugänglich zusätzliche Elektronendichte
	S207-Umgebung	zugänglich benachbarte α -Helix nicht lokalisiert zusätzliche Elektronendichte theoretische Phosphorylierungsstelle
$\alpha 4$	S49-Umgebung	sehr gut zugänglich, da Schlaufe auf der Oberfläche 2 bis 3 Aminosäuren nicht lokalisiert
	T141, S166, T183	zugänglich, theoretische Phosphorylierungsstellen
$\alpha 6$	T11	zugänglich, theoretische O-GlcNAc Stelle
	S165	zugänglich, theoretische Phosphorylierungsstelle
	S177	sehr gut zugänglich, da auf kleiner Spitze exponiert diffuse Elektronendichte für Seitenkette theoretische Phosphorylierungsstelle
	T206-T207	beide zugänglich eine theoretische Phosphorylierungsstelle eine theoretische O-GlcNAc Stelle

Um erste Hinweise auf eine mögliche Regulation der proteasomalen Aktivität durch O-GlcNAc nach der *L. monocytogenes* Infektion zu erlangen, wurden in der 2D-Gelelektrophorese separierte Leberproteasomen aus den Wildtyptieren vom Tag 0 und Tag 6 p.i. geblottet und mit dem MA1-076 Antikörper gegen O-GlcNAc inkubiert (**Abb. 41**). Wie auf Grund der 1D-Gele zu erwarten war (vergl. **Abb. 38**), wurden auch in den 2D-Gelen die meisten mit Coomassie gefärbten Spots durch den Antikörper detektiert. In den Tag 0

Proteasomen ließ sich $\alpha 3$ mit dem MA1-076 Antikörper nicht sehr gut anfärben, in den Tag 6 p.i. Proteasomen hingegen war $\alpha 3$ deutlich zu erkennen. Besonders auffällig war dies in Bezug auf die Coomassie-Färbungen der $\alpha 3$ -Spots. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die aktiven Untereinheiten ausgetauscht wurden, sondern dass mit durch die Infektion ausgelösten Glycosylierungen weitere Regulationsmechanismen am Proteasom angesetzt haben könnten.

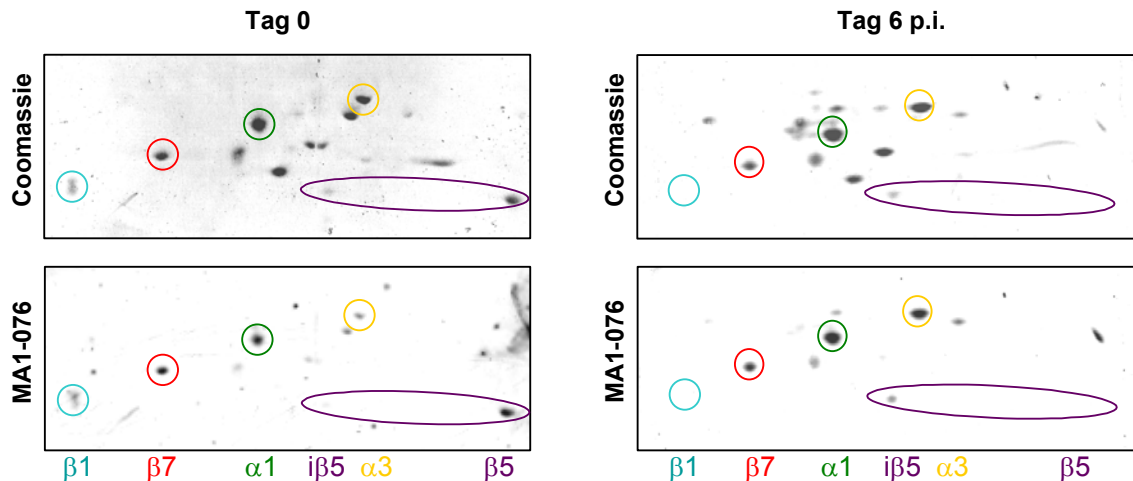


Abb. 41: O-GlcNAc Nachweis an Leberproteasomen aus *L. monocytogenes* infizierten Mäusen. Leberproteasomen der Wildtypiere vom Tag 0 und Tag 6 p.i. wurden in der Mini-2D-Gelelektrophorese separiert und geblottet. Es sind die Coomassie-gefärbten Membranen und darunter die Färbung der jeweiligen Membran mit MA1-076 Antikörper gezeigt. Kreise markieren die proteasomalen Untereinheiten: türkis – $\beta 1$; rot – $\beta 7$; dunkelgrün – $\alpha 1$; orange – $\alpha 3$; violett – $i\beta 5/\beta 5$ -Paar.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass 20S Proteasomen mit O-GlcNAc modifiziert werden können und dass die Infektion mit *L. monocytogenes* einen regulatorischen Effekt auf den Glycosylierungsstatus ausübt. Inwieweit diese Modifikation der 20S Proteasomen einen funktionellen und eventuell sogar gewebespezifischen Einfluss auf die proteasomale Funktion besitzt, kann bislang nur theoretisch diskutiert werden. Für die experimentelle Klärung dieser Fragestellungen sind weitere und sensitivere Nachweismethoden für O-GlcNAc erforderlich, die derzeit getestet und etabliert werden.

4 DISKUSSION

4.1 Modifikation der Proteasomen mit O-GlcNAc

Das zentrale nicht-lysosomale proteolytische System der Zelle, das Proteasomensystem, besteht aus den katalytisch aktiven 20S Proteasomen sowie zwei regulatorischen Komplexen, welche die proteasomale Funktion und Aktivität beeinflussen können. Ist der 19S Regulator mit dem 20S Proteasom assoziiert, werden vorrangig polyubiquitinierte Substrate abgebaut, zu denen unter anderem kurzlebige und defekte Proteine gehören. Alternativ resultiert die Bindung von PA28-Komplexen meist in der verstärkten Generierung der Epitopprecursor und Epitope, die den CTLs durch die Bindung an MHC-Klasse-I Moleküle zu der Erkennung infizierter und entarteter Zellen verhelfen. Zudem sind generell posttranslationale Modifikationen geeignet, die Aktivitäten von Proteinen zu regulieren. Auch für das Proteasomensystem sind einige posttranslationale Modifikationen beschrieben worden, die möglicherweise Einfluss auf die proteasomale Funktion nehmen. So konnte die Arbeitsgruppe von A. J. Rivett nachweisen, dass IFN γ die Phosphorylierung von einigen 19S Untereinheiten inklusive der ATPase-Untereinheit S4 und den proteasomalen Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 7$ reduziert (Bose et al., 2001; Mason et al., 1998). Infolge der Dephosphorylierungen werden die aus einem 20S Proteasom und zwei 19S Regulatoren bestehenden 26S Proteasomen destabilisiert und somit die Bildung von Komplexen aus 20S und PA28 begünstigt (Bose et al., 2001; Bose et al., 2004). Dies bedeutet, dass IFN γ nicht nur an der Induktion, sondern auch an der Interaktion der beiden Komplexe beteiligt ist und so einen großen Einfluss auf die verbesserte Epitop- und Precursorgenerierung besitzt. Da der IFN γ -Spiegel nach der *Listeria monocytogenes* Infektion – wie in der vorliegenden Arbeit dokumentiert (**Abb. 9**) – steigt, kann vermutet werden, dass der von Bose *et al.* beobachtete Effekt auch im Infektionsverlauf eine Rolle bei der Epitoppräsentation spielt.

Für mehrere cytosolische und nukleäre Proteine wurde antagonistisch zu einer Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste eine Glycosylierung mit dem Monosaccharid O-GlcNAc an denselben oder an benachbarten Aminosäuren beschrieben (Slawson und Hart, 2003). Kürzlich zeigte die Arbeitsgruppe von J. E. Kudlow, dass die Glycosylierung der 19S ATPase-Untereinheit S4 mit O-GlcNAc den Abbau des Transkriptionsfaktors Sp1 und den eines hydrophoben fluorogenen Substrates inhibiert (Zhang et al., 2003). Als zu Grunde liegender Mechanismus dieser Inhibition wurde postuliert, dass die proteasomalen Substrate nicht angemessen entfaltet werden, weil die eventuell hierfür notwendigen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der ATPase S4 und dem Substrat nicht eingegangen werden können. Ein Effekt auf die katalytisch aktiven β -Untereinheiten konnten Zhang *et al.* nicht nachweisen (Zhang et al., 2003). Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass die Infektion von

Mäusen mit *L. monocytogenes* zu einer verstärkten Glycosylierung der $\alpha 3$ -Untereinheit führte (**Abb. 41**), was wie bei Zhang *et al.* nicht mit der Inhibition von 20S Proteasomen oder einer reduzierten Epitopbildung einherging (**Abb. 18B**).

Aus diesen drei Beobachtungen – 1. Inhibition der 26S aber nicht der 20S Proteasomen durch Glycosylierung, 2. Zunahme der $\alpha 3$ -Glycosylierung nach der Infektion, 3. Dissoziation des 26S in 20S Proteasom und 19S Regulator durch IFN γ -ausgelöste Dephosphorylierung – lässt sich das folgende Modell formulieren: Eine reziproke Phosphorylierung/Glycosylierung von S4 und $\alpha 3$ würde ermöglichen, dass infektionsbedingt ausgeschüttetes IFN γ zur Dephosphorylierung und daran anschließend zur Glycosylierung dieser Untereinheiten führt. Das könnte die Aktivität von 26S Proteasomen einerseits durch Inhibition und andererseits durch die Dissoziation in 20S Proteasomen und 19S Regulatoren reduzieren. Da die α -Untereinheiten für die Interaktion mit 19S Regulator und PA28 verantwortlich sind (Davy *et al.*, 2001; Kania *et al.*, 1996; Stohwasser *et al.*, 2003; Whitby *et al.*, 2000), könnten hier wechselnde posttranslationale Modifikationen einen Einfluss auf diese Bindungen ausüben. Demnach würde die Glycosylierung in der Infektion den Effekt der Dephosphorylierung unterstützen und durch eine gesteigerte Interaktion von PA28 mit den durch O-GlcNAc modifizierten aber nicht inhibierten 20S Proteasomen die Generierung immunrelevanter Fragmente begünstigen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass neben der Untereinheit $\alpha 3$ weitere Untereinheiten der 20S Proteasomen mit O-GlcNAc modifiziert sind. In den mit Proteasomen aus RMA-Zellen und aus Lebergewebe durchgeführten Versuchen reagierten sämtliche Untereinheiten mit mindestens einem der O-GlcNAc spezifischen Antikörper MA1-076 und CTD-110.6 oder dem WGA-Lektin. Die spezifische Kompetition der Antikörper- und Lektinbindung an die proteasomale Untereinheiten durch die Zugabe von freiem GlcNAc in die Inkubationsansätze bestätigte, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Artefakte handelte (**Abb. 38**). Zudem konnten in einer kürzlich erschienenen Publikation – den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entsprechend – fast alle Untereinheiten der 20S Proteasomen aus *Drosophila melanogaster* mit Antikörpern und WGA-Lektin detektiert werden (Sumegi *et al.*, 2003). Die einzige Ausnahme bildete die Untereinheit $\alpha 1$, die sich in den murinen Proteasomen durch die Bindung des MA1-076 Antikörpers und des WGA-Lektins als hingegen sehr stark mit O-GlcNAc assoziiert darstellte. Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf den verschiedenen Spezies, aus denen die Proteasomen isoliert wurden, da auch für die Phosphorylierung an den Proteasomen dementsprechendes beschrieben wurde: So ist für *Candida albicans* eine Phosphorylierung von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ gezeigt worden, die in *Saccharomyces cerevisiae* nicht nachgewiesen werden konnte (Fernandez Murray *et al.*, 2002; Iwafune *et al.*, 2002).

Wie die Analysen der in der Gelelektrophorese nach Schagger/vonJagow und in der Mini-2D-

Gelelektrophorese aufgetrennten 20S Proteasomen ergab, detektierten die beiden Antikörper und das WGA-Lektin die einzelnen Untereinheiten mit jeweils unterschiedlichen Intensitäten (**Abb. 38** und nicht gezeigt). Die Untereinheit $\beta 4$ z.B. wurde durch den Antikörper CTD-110.6 sehr stark, aber durch MA1-076 und das WGA-Lektin nur wenig angefärbt. MA1-076 hingegen reagierte deutlich mit $\beta 7$, während diese Untereinheit etwas weniger intensiv mit dem WGA-Lektin und nur sehr schwach mit CTD-110.6 nachgewiesen werden konnte. Die Abhängigkeit von der gewählten Detektionsmethode wurde auch in der schon zitierten Arbeit von Sumegi *et al.* beschrieben, in der das 20S Proteasom und der 19S Regulator auf O-GlcNAc Modifikationen untersucht wurden (Sumegi *et al.*, 2003). Hierdurch wird deutlich die Notwendigkeit unterstrichen, weitere sensitivere Methoden zum Nachweis der O-Glycosylierung zu entwickeln, die außerdem eine Quantifizierung ermöglichen. Nachdem die versuchte *in vivo* Markierung mit ^{14}C -Glucosamin nicht erfolgreich war, da das Monosaccharid in die Aminosäuresynthese gelangte und somit die Proteine unspezifisch markiert wurden (**Abb. 39**), ist eine *in vitro* Markierung mit ^{14}C -Galactose zu testen: Das Enzym Galactosyltransferase koppelt die markierte UDP-Galactose über eine $\beta(1\rightarrow 4)$ glycosidische Bindung spezifisch an GlcNAc (Roquemore *et al.*, 1994). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass bei der *in vitro* Verwendung von isolierten 20S Proteasomen der Übergang der ^{14}C -Galactose in andere Stoffwechselwege ausgeschlossen und daher die Spezifität gewahrt ist. Darüber hinaus wird in Zusammenarbeit mit Dr. Katharina Janek versucht, über eine beta-Elimination der Zuckergruppe mit anschließender Derivatisierung die O-GlcNAc modifizierten Peptide auch massenspektrometrisch zu analysieren (Greis *et al.*, 1996).

Bereits 1993 wurde veröffentlicht, dass Proteasomen in der Zelle glycosyliert vorliegen können (Schmid *et al.*, 1993). Die Daten deuteten an, dass es sich dabei um Polysaccharide inklusive Mannose und Sialinsäure handelt. Weiterhin wurden in Proteasomenpräparationen geringe Mengen solcher Zuckermoleküle nachgewiesen, wie sie in den komplexen Kohlenhydratverbindungen im ER vorkommen (nicht gezeigte Daten sowie persönliche Mitteilung von Dr. Martin Zimmermann-Kordmann, FU, und Nicola Klare). Dies könnte zu der Vermutung führen, dass Proteasomen entgegen bisheriger Kenntnisse auch durch das ER und den Golgi-Apparat transportiert würden, wo sie wie die sekretierten Proteine mit den verschiedenen Zuckermolekülen versehen werden könnten. Jedoch gibt es in den Sequenzen der proteasomalen Untereinheiten aus Mammalia weder einen Hinweis auf ein Signalpeptid für die Lokalisation im ER noch auf das ER-Retentionssignal. In zwei Fällen wird trotzdem von Proteasomen außerhalb der Zellen berichtet: Erstens können freie 20S Proteasomen im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. Dort gelten sie allerdings als Marker für Zellschäden und Defekte in der Apoptose, was letztendlich bedeutet, dass sie nicht über den üblichen Transportweg in das Serum gelangt sein können (Egerer *et al.*, 2002; Mountz *et al.*, 1994). Zweitens werden Proteasomen auch am Acrosom der

Spermatozoen detektiert (Morales et al., 2004; Ziemba et al., 2002). Doch da das vom Golgi-Apparat abstammende Acrosom zusammen mit dem Nukleus immer noch von der Zellmembran umgeben ist (Ramalho-Santos et al., 2002), könnten die mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesenen Proteasomen auch in dem engen Bereich zwischen Acrosom und Zellmembran lokalisiert sein (Berruti und Martegani, 2004). Aus den genannten Gründen lässt sich eine Glycosylierung von Proteasomen innerhalb der Organellen des regulären sekretorischen Weges ausschließen.

Auch die Modifikation der Proteasomen mit verschiedenen Zuckern in Autophagosomen ist unwahrscheinlich. Wird zu Grunde gelegt, dass der Abbau der Proteasomen lysosomal erfolgt, könnten Proteasomen in Autophagosomen zu den Lysosomen transportiert werden (Cuervo et al., 1995). Allerdings bliebe dann zu klären, wie funktionsfähige Glycosyltransferasen aus dem ER und Golgi-Apparat in die Autophagosomen gelangen. Unter Umständen wäre es denkbar, dass fehlgeleitete Glycosyltransferasen des Golgi-Apparats über den vesikulären Transport die Endosomen erreichen. Autophagosomen verschmelzen mit Endosomen, bevor sie mit den Lysosomen fusionieren (Mizushima et al., 2002), und auf diesem Weg könnten die Proteasomen mit den Glycosyltransferasen in Kontakt treten. Die Transferasen könnten solange weiterhin aktiv sein, bis der pH-Wert zu stark unter ihre Funktionsoptima gefallen ist. Es ist jedoch sehr fraglich, ob über diesen Mechanismus genug modifizierte Proteasomen entstehen würden, dass sie trotz der schnellen Degradation in den Lysosomen nachweisbar sind (Cuervo et al., 1995).

Eine andere Möglichkeit, die Existenz der komplexen Polysaccharide in den Proteasomenpräparationen zu erklären, wäre, dass Proteasomen nicht in Organellen sondern im Cytosol der Zelle selektiv und koordiniert mit den komplexen Glycanen verbunden werden. Solche cytosolischen Mechanismen sind indes nur für niedere Eukaryoten wie für den Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* bekannt. Die an dieser Glycosylierung beteiligten Enzyme weisen zwar Homologien zu Proteinen der Metazoa auf, in denen sind sie jedoch ausschließlich im Golgi-Apparat lokalisiert (West et al., 2004). Unter diesem Aspekt betrachtet ist die komplexe Glycosylierung des Proteasoms im Cytosol ebenfalls wenig wahrscheinlich. Eine weitere Erklärung für den Nachweis der komplexen Kohlenhydratverbindungen in den 20S Proteasomenisolationen könnten Verunreinigungen der Präparationen sein. Proteine, die die Qualitätskontrolle im ER nicht bestehen, werden samt den bereits an sie übertragenen Kohlenhydraten ins Cytosol befördert. Zwei Enzymkomplexe der Ubiquitinierungskaskade erkennen spezifisch diese Oligosaccharide, markieren die an sie gebundenen Proteine mit Polyubiquitin und führen sie so der proteasomalen Degradation zu (Yoshida et al., 2002; Yoshida et al., 2003). Im Cytosol sind also die von den ubiquitinierten ER-Proteinen abgespaltenen Oligosaccharide vorhanden, die womöglich unspezifisch mit Proteasomen assoziieren und daher eventuell mit ihnen zusammen angereichert werden könnten. Durch die

Zugabe von freien Monosacchariden zu isolierten 20S Proteasomen kann die *in vitro* gemessene proteasomale Aktivität in Bezug auf fluorogene Substrate beeinflusst werden (Dr. Ulrike Kuckelkorn, persönliche Mitteilung). Dies könnte ein Hinweis sein, dass Proteasomen auch unspezifisch mit Zuckern interagieren und würde so für eine Co-Anreicherung und gegen eine spezifische Modifizierung mit den komplexen Glycanen sprechen.

Es kann zusammengefasst werden, dass Proteasomen mit GlcNAc modifiziert in der Zelle vorkommen. Die genaue Art der Glycosylierung ist noch nicht vollständig geklärt, wobei jedoch die reziproke Modifikation mit Phosphat und dem Monosaccharid O-GlcNAc als die wahrscheinlichste anzusehen ist, da sie sehr weit verbreitet ist und im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten zum Proteasom sogar eine funktionelle Relevanz besitzen kann (Abb. 42). Die komplexen Zuckerstrukturen in den Proteasomenpräparation wären demnach Verunreinigungen, die auf Grund der unspezifischen Interaktion mit den Proteasomen sehr schlecht abzutrennen sind. Um den Sachverhalt weiter aufzuklären, sind zusätzliche Analysen der Struktur und Funktion z.B. unter Cytokineinfluss oder in der Infektion notwendig, die durch verbesserte Detektionsmethoden erleichtert werden.

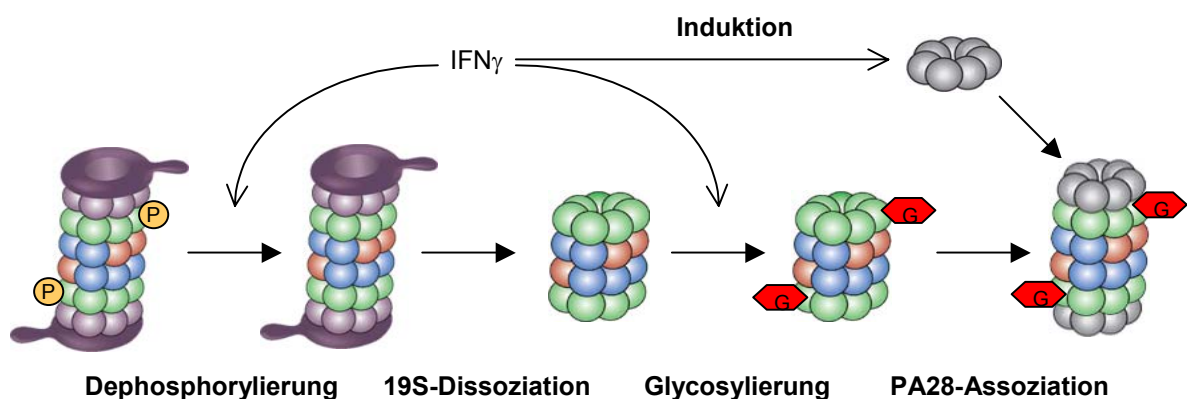


Abb. 42: Modell für den Einfluss der reziproken Phosphorylierung/Glycosylierung auf die Interaktionen des 20S Proteasoms. Das in der Infektion ausgeschüttete IFN γ bewirkt eine Dephosphorylierung des 26S Proteasoms, das daraufhin destabilisiert wird und in 20S Proteasom und 19S Regulatoren dissoziiert. IFN γ verursacht möglicherweise die Glycosylierung des freien 20S Proteasoms mit O-GlcNAc, was die Bindung des durch IFN γ induzierten PA28-Komplexes begünstigen könnte. violett – 19S Regulator; grün – α -Untereinheiten; blau – nicht-aktive β -Untereinheiten; rot – proteolytisch aktive β -Untereinheiten; grau – PA28-Komplex; oranger Kreis mit P – Phosphorylierung; rotes Sechseck mit G – Glycosylierung mit O-GlcNAc. (Teile der Abbildung sind (Kloetzel, 2004) entnommen)

4.2 Struktur- und Funktionsvergleich der Proteasomen aus den verschiedenen Organen

In Mammaliazellen können zwei verschiedene 20S Proteasomenarten auftreten: zum einen die konstitutiven Proteasomen und zum anderen die Immunoproteasomen, die sich durch den Austausch der drei katalytisch aktiven konstitutiven Untereinheiten gegen die drei aktiven induzierbaren Immuno-Untereinheiten auszeichnen. Dementsprechend zeigen auch aus verschiedenen Organen isolierte 20S Proteasomen diese Unterschiede in der Struktur, wobei in den Muskeln und dem Gehirn hauptsächlich konstitutive Proteasomen nachweisbar sind, während in der Lunge und der Leber auch Immunoproteasomen auftreten, die in der Milz eindeutig überwiegen (Cardozo et al., 1995; Dahlmann et al., 2000; Murata et al., 2001; Noda et al., 2000). Die Arbeit von Kuckelkorn *et al.* brachte diese Gewebsunterschiede erstmals in einen funktionellen Zusammenhang mit der Epitopgenerierung (Kuckelkorn et al., 2002): 20S Proteasomen, die aus den lymphatischen Organen Milz und Thymus sowie dem lymphatischen Gewebe enthaltenden Dünndarm isoliert wurden, zeigen eine Beziehung zwischen der proteasomalen Zusammensetzung und der erhöhten Bildung eines Epitop-precursors. Die proteasomale Gewebespezifität könnte somit erklären, warum für dieses Epitop spezifische CTLs nur gegen den Dünndarm, nicht aber gegen den Colon eine Autoimmunantwort induzieren (Kuckelkorn et al., 2002; Steinhoff et al., 1999).

Darauf aufbauend sollte die vorliegende Arbeit untersuchen, ob 20S Proteasomen nicht nur, wie gezeigt, in den einzelnen Organen eine unterschiedliche Untereinheitenzusammensetzung und proteolytische Funktion aufweisen, sondern ob diese auch innerhalb der Organe dynamisch reguliert sind. Als Modell wurde die immunphysiologische gut charakterisierte murine Infektion mit *Listeria monocytogenes* verwendet. Die Proteasomen, die aus den nicht-lymphatischen Organen Leber und Colon der Wildtypiere isoliert wurden, zeigten in der Westernblotanalyse und in der 2D-Gelelektrophorese eine Zunahme der Immuno-Untereinheiten bei gleichzeitiger Abnahme der konstitutiven Untereinheiten nach der Infektion (**Abb. 25**, **Abb. 28**). Die Proteasomen der lymphatischen Organe Milz und Dünndarm dagegen besaßen schon vor der Infektion deutlich nachweisbare Mengen der Immuno-Untereinheiten (**Abb. 26**, **Abb. 27**). Ein Anstieg der Immuno-Untereinheiten in den Leberproteasomen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* oder LCMV wurde auch von Khan *et al.* beobachtet (Khan et al., 2001). Ebenso konnte bei einer Infektion mit dem Pilz *Histoplasma capsulatum* eine Zunahme von Immuno-Untereinheiten in der Leber, der Lunge sowie der Milz nachgewiesen werden (Barton et al., 2002). Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Infektion keine verstärkte Inkorporation von Immuno-Untereinheiten in die Milzproteasomen induziert (**Abb. 27**). Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Struktur der Milzproteasomen könnten – neben den verschiedenen

Infektionsmodellen – darauf zurückzuführen sein, dass die vorliegende Arbeit die drei aktiven Untereinheiten in vollständig assemblierten und funktionsfähigen Proteasomen analysierte, während in der Veröffentlichung von Barton *et al.* nur eine einzige Immuno-Untereinheit im Milzhomogenat untersucht wurde. Im Homogenat nachgewiesene Untereinheiten müssen nicht unbedingt in die Proteasomen integriert sein, da z.B. die Inkorporationen von $\text{i}\beta 1$ und $\text{i}\beta 2$ voneinander abhängig sind (Groettrup *et al.*, 1997). Aus diesem Grund sind die auf Homogenatanalysen basierenden Resultate über die Struktur funktionsfähiger Proteasomen nur wenig aussagekräftig.

Das Vorhandensein der Immuno-Untereinheiten in den isolierten Gewebeproteasomen korrelierte mit der verstärkten *in vitro* Generierung der immunrelevanten Peptide sowie der N- und C-terminal flankierenden Fragmente aus dem bakteriellen LLO-Substrat (**Abb. 18-21**, **Abb. 25-28**). Die vorgelegte Arbeit zeigte somit zum ersten Mal, dass Immunoproteasomen zu der verbesserten Produktion auch von bakteriellen Epitopen und Precursorpeptiden führen, da sich die Analysen von Epitopen aus Fremdproteinen bislang nur auf virale Epitope beschränkten (Kloetzel, 2001; Sijts *et al.*, 2001). Die möglichen Gründe für das unterschiedliche Schnittverhalten von konstitutiven Proteasomen und Immunoproteasomen werden in Kapitel 4.4 diskutiert. Des Weiteren wurde erstmalig für den Infektionsverlauf die proteasomale Struktur mit der proteasomalen Funktion in Verbindung gebracht, wohingegen Barton *et al.* und Khan *et al.* in ihren Infektionsmodellen keine physiologischen Konsequenzen für die proteasomale Funktion darstellten (Barton *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2001): Die vorliegende Arbeit ergab 1. eine gleichbleibend hohe Bildung von Epitop und Precursor durch Proteasomen, die aus den Immunoproteasomen-reichen Geweben Milz und Dünndarm vor und nach der Infektion stammten, sowie 2. einen Anstieg der Epitop- und Precursorgenerierung durch Proteasomen, die aus Leber und Colon nach der Infektion isoliert wurden und vermehrt Immunoproteasomen enthielten.

Die *in vitro* Degradationen des murinen Hsp60-Substrates durch die Gewebeproteasomen lieferten die gleichen Resultate wie die Experimente mit dem bakteriellen LLO-Substrat: Die Epitope und Precursor beider Substrate wurden von Immunoproteasomen stärker gebildet als von konstitutiven Proteasomen (**Abb. 18-21**, **Abb. 23A**). Dies lässt darauf schließen, dass die Proteasomen in diesem Fall keinen Unterschied zwischen Fremd- und Selbstproteinen machten. Es sind jedoch Epitope aus körpereigenen Substraten beschrieben, die von Immunoproteasomen weniger effizient generiert werden, als von konstitutiven Proteasomen (Morel *et al.*, 2000; Van den Eynde und Morel, 2001). Hierzu muss allerdings angemerkt werden, dass sich diese Ergebnisse in unserem Labor nicht reproduzieren ließen (Dr. Ulrike Seifert, persönliche Mitteilung). Zusammen mit den Daten der vorliegenden Arbeit erscheint es demnach unwahrscheinlich, dass ein Mechanismus existiert, der es den Proteasomen erlaubt, zwischen Fremd- und Selbstsubstraten zu differenzieren.

Die Auswertung der Prozessierungsexperimente mit dem viralen pp89-Substrat ergaben ein interessantes Bild im Vergleich mit der Literatur (**Abb. 23B**). Es ist beschrieben, dass Immunoproteasomen, die aus in Kultur wachsenden Zellen isoliert wurden, im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen den Epitopprecursor aus dem pp89-Substrat erhöht produzieren, jedoch nicht das Epitop selbst (Boes et al., 1994; Kuckelkorn et al., 1995; Sijts et al., 2001). Wurde in dieser Arbeit das pp89-Substrat *in vitro* mit den Immunoproteasomen-haltigen Präparationen inkubiert, die aus der Leber nach der Infektion stammten, wurde nicht nur wie durch die Literatur erwartet der Precursor verstärkt gebildet, sondern auch das Epitop (**Abb. 23B** und nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu bildeten die Immunoproteasomen des Colons weder das Epitop noch den Precursor verstärkt aus dem pp89-Substrat. Daraus folgt, dass sich die Immunoproteasomen aus Leber und aus Colon nach der Infektion sowie aus kultivierten Zellen hinsichtlich ihres Prozessierungsverhaltens bezüglich des pp89-Substrates unterscheiden. Dieselben Immunoproteasomen zeigten jedoch keine funktionellen Divergenzen bei den Versuchen mit LLO- und Hsp60-Substrat (**Abb. 18-21**, **Abb. 23A**). Dies deutet darauf hin, dass ein gewebespezifischer Unterschied zwischen den Immunoproteasomen der Leber und denen des Colons existiert, der sich nur auf einige Substrate auswirkt. Auch die Effekte von PA28 und den Immuno-Untereinheiten sind substratspezifisch wie in der Einleitung ausführlich dargestellt (Groettrup et al., 1996b; Sijts et al., 2000a). Insofern könnte eine posttranslationale Modifikation der Gewebeproteasomen vorliegen, die diese Divergenzen im Prozessierungsverhalten und damit auch die Substratspezifität verursacht. Ähnliches wurde auch in der Veröffentlichung von U. Kuckelkorn vorgeschlagen (Kuckelkorn et al., 2002). Auf Grund der Tatsache, dass die Colonproteasomen in der Westernblotanalyse nur auf das Vorhandensein der konstitutiven und Immuno-Untereinheiten hin getestet wurden (**Abb. 28**), kann in der vorliegenden Arbeit über die Natur der strukturellen Unterschiede zwischen den Immunoproteasomen aus Leber und Colon keine Aussage getroffen werden.

Ein weiterführender Ansatz wäre, die verschiedenen Gewebeproteasomen z.B. hinsichtlich der Modifikation mit O-GlcNAc zu untersuchen, da für die Leberproteasomen bereits eine Zunahme der Glycosylierung in der Infektion gezeigt werden konnte (**Abb. 41**). Wäre diese Modifikation nicht bei den Colonproteasomen nach der Infektion nachzuweisen, könnte sie ein potentieller Grund für die funktionellen Divergenzen zwischen den beiden Immunoproteasomenpräparationen sein. In diesem Zusammenhang wäre, wie in Kapitel 4.1 diskutiert, gleichfalls der Phosphorylierungsstatus der Proteasomen interessant. Da die Präparationen und Prozessierungsansätze weder den 19S Regulator noch den PA28-Komplex enthielten, müssten die posttranslationalen Modifikationen selbst einen Effekt auf die proteolytische Aktivität der Proteasomen besitzen. Es wäre vorstellbar, dass dies analog zu den subtilen Konformationsänderungen und der darauf folgenden Modulation der proteasomalen Aktivität

geschieht, die für die Interaktion von PA28 mit 20S Proteasomen gezeigt wurde (Sun et al., 2002). Auch die Bindung von hydrophoben Peptiden an die nicht-aktive Untereinheiten beeinflussen die Funktionalität der 20S Proteasomen (Kisselev et al., 2002). Zudem ist vorstellbar, dass eine posttranslationale Modifikation einen Einfluss auf den Eintritt einiger Substrate in die 20S Proteasomen ausübt, indem z.B. die Bindestelle eines bestimmten Substrates an den α -Ring maskiert wird.

Die Zunahme der Immunoproteasomen und der damit verbundenen gesteigerten Epitop- und Precursorgenerierung aus LLO-, Hsp60- und teilweise pp89-Substrat war ausschließlich mit den Proteasomenpräparationen aus den nicht-lymphatischen Organen zu beobachten (**Abb. 18, Abb. 19, Abb. 23, Abb. 25, Abb. 28**). Sowohl in der Leber als auch der Milz konnten hohe *L. monocytogenes* Titer gemessen werden; im Colon und Dünndarm der Wildtypmäuse waren dagegen keine Bakterien nachweisbar (**Abb. 8A**). Da das nicht-infizierte Colongewebe parallel zu der infizierten Leber auf die Infektion mit der Bildung von Immunoproteasomen reagierte, bedeutet dies ganz klar, dass *L. monocytogenes* die Expression der Immuno-Untereinheiten nicht direkt beeinflussen kann. Offensichtlich unabhängig davon, in welchem Organ sich der Infektionsherd befand, erhöhte sich in den untersuchten nicht-lymphatischen Gewebe der Anteil der Immunoproteasomen. Die hauptsächlich aus Immunoproteasomen bestehenden Proteasomenpräparationen aus den lymphatischen Geweben zeigten weder strukturell noch funktionell eine Veränderung nach der Infektion (**Abb. 20, Abb. 21, Abb. 23, Abb. 26, Abb. 27**). Auch die starke Besiedlung der Milz durch *L. monocytogenes* im Infektionsverlauf löste keine weitere Induktion der Immunoproteasomen aus. Dies zeigt ebenfalls eindeutig, dass nicht der direkte Kontakt mit den Bakterien für die Regulation der Immuno-Untereinheiten verantwortlich ist, und dass somit keine der von *L. monocytogenes* in das Cytosol der Wirtszelle sekretierten Proteine hieran beteiligt sind. In Kapitel 4.3 wird näher auf die Mechanismen eingegangen werden, die der immunoproteasomalen Regulation zugrunde liegen.

Eine Erklärung für den Anstieg des Immunoproteasomenanteils in den nicht-lymphatischen Organen wäre, dass nach der Infektion lymphatische Zellen einwandern, für die nachgewiesen wurde, dass sie in Kultur wachsend die Immuno-Untereinheiten exprimieren (Melanie Rieger, persönliche Mitteilung) (Macagno et al., 1999; Morel et al., 2000). Ein anderer Grund für die Zunahme der Immunoproteasomenmenge könnte jedoch auch darin liegen, dass die Gewebezellen selbst auf die Infektion mit der Expression der Immuno-Untereinheiten und dadurch gesteigerter Epitopgenerierung reagierten. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass Makrophagen und dendritische Zellen in die Leber und auch in das Colongewebe einwanderten. Die Fluoreszenzanalysen zeigten aber, dass ebenfalls in den Epithelzellen des Colon und in den Hepatocyten eine Zunahme der Immuno-Untereinheiten nach der Infektion erfolgte (**Abb. 32**). Hinzu kam, dass die Proteasomen, die aus den

Hepatocyten von *L. monocytogenes* befallenen Mäusen isoliert und analysiert wurden, sich strukturell und funktionell wie diejenigen Proteasomen verhielten, die aus der gesamten Leber infizierter Tiere stammten (**Abb. 31**). Zusammengefasst bedeutet dies, dass nicht-lymphatische Zellen auch zu dem Anstieg der Immunoproteasomen in den Organen beitrugen.

Hieraus ergeben sich die folgenden Fragen: Lässt sich ein sinnvoller Nutzen für die Bekämpfung der *L. monocytogenes* Infektion aus der Gegebenheit ziehen, dass auch nicht-lymphatische und sogar nicht direkt betroffene Zellen und Gewebe auf die Infektion reagieren? Und ist der mögliche Nutzen auch auf andere Infektionen und Erreger übertragbar? Ob eine in den Hepatocyten verbesserte Epitoppräsentation auf Grund der Zunahme an Immunoproteasomen überhaupt eine Rolle spielt, ist nicht geklärt, da die Induktion einer CTL-basierten Immunantwort gegen Hepatocyten umstritten ist. Die Hepatocyten sind durch die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSECs) von dem direkten Kontakt mit den zirkulierenden CTLs getrennt. LSECs können wie professionell Antigen präsentierende Zellen exogene Antigene aufnehmen und T-Helferzellen sowie CTLs zur Proliferation anregen. Dies resultiert jedoch nicht in der Aktivierung der T-Zellen sondern in der Toleranz der T-Zellen gegenüber dem präsentierten Antigen (Limmer et al., 2000). LSECs könnten listerielle MHC-Klasse-I Epitope – entweder weil sie diese exogen aufgenommen haben, oder weil sie selbst infiziert sind – präsentieren, was dazu führen würde, dass die Immunantwort gegen *L. monocytogenes* unterdrückt wird. Andererseits scheinen proinflammatorische Cytokine wie TNF α einen inhibitorischen Effekt auf die Epitoppräsentation der LSECs auszuüben (Knolle et al., 1999). Da diese Cytokine besonders im Frühstadium der *L. monocytogenes* Infektion ausgeschüttet werden, ist der immunsuppressive Einfluss der LSECs möglicherweise so weit reduziert, dass über andere Wege aktivierte CTLs in das Leberparenchym einwandern, infizierte Hepatocyten spezifisch erkennen und lysieren können. Die spezifische Lyse von Hepatocyten durch aktivierte CTLs ist bereits in dem für ein HBV-Protein transgenen Mausmodell beschrieben worden (Ando et al., 1994). Dies zeigt, dass auch Hepatocyten das Ziel von aktivierten CTLs sein können. Da die Hepatocyten auch von *L. monocytogenes* infiziert werden (Rogers et al., 1996), benötigen sie sowie alle anderen Wirtszellen der Pathogene eine durch Immunoproteasomen verbesserte Epitoppräsentation, um im Falle einer Infektion von den CTLs besser erkannt und eliminiert zu werden.

Weil neben den Leberzellen auch in nicht-infizierten Geweben wie dem Colon die Induktion von Immunoproteasomen erfolgt (**Abb. 8, Abb. 25, Abb. 28, Abb. 31, Abb. 32**), kann dies als eine allgemeine Reaktion sämtlicher nicht-lymphatischer Körperzellen auf die *L. monocytogenes* Infektion angesehen werden: Durch die erhöhte Bildung von Immunoproteasomen versetzt sich der gesamte Organismus in Alarmbereitschaft, egal, wo der Infektionsherd liegt. Analog dazu zeigten Masopust *et al.*, dass bei verschiedenen Infektionen die spezifische CTLs in allen untersuchten Geweben akkumulieren, und zwar ebenfalls

unabhängig vom Infektionsherd (Masopust et al., 2001). In der adaptiven Immunantwort scheint sich somit der Organismus auf zwei aufeinander abgestimmte Arten vor einer systemischen Infektion zu schützen: Bei einer weiteren Ausbreitung des Erregers in gesundes nicht-lymphatisches Gewebe ermöglichen bereits vorher induzierte Immunoproteasomen die gesteigerte Generierung der immunrelevanten MHC-Klasse-I Epitope und Precursor. Damit geben sich neu infizierte Zellen schnellstmöglich den schon im selben Gewebe in Lauerstellung liegenden spezifischen CTLs zu erkennen, was in der Eindämmung der Infektion resultiert. In Kooperation mit Dr. Ulrich Steinhoff, MPIIB, wird überdies gerade der Frage nachgegangen, ob die generalisierte Induktion der Immunoproteasomen im infizierten Körper einen Vorteil bei der Bekämpfung von Suprainfektionen darstellt. In der Tat sieht es so aus, dass die viralen Titer einer der *L. monocytogenes* aufgesetzten LCMV-Infektion schneller sinken als nach einer alleinigen viralen Infektion, was für eine schon voll aktivierte Immunantwort inklusive Immunoproteasomen spricht.

Interessanterweise waren im Dünndarm und der Leber zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion mehr als 60% Immunoproteasomen zu verzeichnen (**Abb. 25**, **Abb. 26**). Auch in der Milz sowie dem Colon waren nach der Infektion weiterhin die drei konstitutiven proteolytisch aktiven β -Untereinheiten nachweisbar (**Abb. 27**, **Abb. 28**). Dies deutet darauf hin, dass *in vivo* weder in den lymphatischen Organen noch nach einer Infektion ein kompletter Austausch der konstitutiven Proteasomen erreicht wird. Ebenfalls zeigte die Analyse einzelner aktiver Untereinheiten in dem viralen (Khan et al., 2001) und dem fungalen (Barton et al., 2002) Infektionsmodell sowie in maturierten Dendritischen Zellen (Macagno et al., 2001) keinen vollständigen Ersatz einer konstitutiven Untereinheit durch ihre korrespondierende Immuno-Untereinheit. In Zellkultur konnten nicht einmal extrem hohe IFN γ -Konzentrationen den Austausch von $\beta 2$ gegen $i\beta 2$ über 50% heben (Stohwasser und Kloetzel, 1996). Darüber hinaus überstieg auch nach Überexpression von $i\beta 1$ und $i\beta 5$ in einem TET-induzierbaren Zellsystem die Austauschrate nie 60% (Sijts et al., 2000b). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen sowohl schneller assemblieren als auch schneller abgebaut werden (Sylvia Heink, persönliche Mitteilung). Die Zellen scheinen also weder eine längerfristige Existenz noch einen über 60% hinausgehenden Anteil der Immunoproteasomen zu tolerieren. Daraus kann geschlossen werden, dass die Funktion der konstitutiven Proteasomen für das Überleben der Zellen essentiell ist und offensichtlich nicht durch die Aktivität der Immunoproteasomen ersetzt werden kann.

Der maximale funktionelle Effekt der Immunoproteasomen auf die Generierung der immunrelevanten Produkte war schon bei einem Anteil von 40% Immunoproteasomen erreicht, wie in den Prozessierungsexperimenten mit den Leberproteasomen des Tages 2 p.i. sichtbar war (**Abb. 18**, **Abb. 23**, **Abb. 25**). Die Zunahme auf 60% Immunoproteasomen in

den Proteasomenpräparationen aus Leber des Tages 6 p.i. führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Epitop- und Precursorbildung. Ein vergleichbarer Schwellenwert konnte von Sijts *et al.* in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, da ein Anteil von 40% der Immuno-Untereinheiten genügte, um eine CTL-Antwort zu erzielen, die auch bei einem Anteil von 60% nicht weiter verbessert wurde (Sijts *et al.*, 2000b).

Die Immuno-Untereinheit i β 5 war vor der Infektion deutlich in den aus Colon und Leber isolierten Proteasomen nachweisbar (**Abb. 25**, **Abb. 28**). Die gesteigerte Generierung der Epitope und Precursor war jedoch erst mit der drastischen Zunahme der anderen beiden Immuno-Untereinheiten ab Tag 2 p.i. zu beobachten (**Abb. 18**, **Abb. 19**, **Abb. 23**). Dies steht im Einklang mit den Daten von Sijts *et al.*, die durch Transfektionsexperimente nachwiesen, dass i β 5 alleine keinen großen Einfluss auf die Degradation eines Peptidsubstrates besitzt (Sijts *et al.*, 2000a). Das Vorhandensein von i β 5 in den Proteasomen vor der Infektion beeinträchtigte also nicht die weiter oben diskutierte essentielle Funktion der konstitutiven Proteasomen. Auf Grund der großen Bedeutung von i β 5 für die effiziente Bildung der Immunoproteasomen (Sylvia Heink, persönliche Mitteilung)(Griffin *et al.*, 1998; Witt *et al.*, 2000) könnte es sich im Falle einer Infektion sogar als positiv erweisen, dass in den Geweben bereits geringe Mengen an i β 5 existieren, weil dadurch eine sofortige und schnelle Assemblierung der Immunoproteasomen nach der anlaufenden Induktion der Immuno-Untereinheiten gewährleistet wäre.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass sich die proteasomale Funktion und Struktur nicht nur – wie schon beschrieben – lokal zwischen den einzelnen Organen unterscheiden, sondern dass sich diese ausgelöst durch eine Infektion auch innerhalb eines Organs dynamisch und temporär ändern können. Die Art der Infektion nimmt keinen Einfluss auf die Funktionsänderung, da diese mittels der Prozessierung von einem Selbst- sowie von zwei Fremdepitopen nachweisbar war. Zudem konnte eindeutig gezeigt werden, dass die proteasomale Dynamik nicht nur auf ein infiziertes Organ oder einen direkt betroffenen Zelltyp beschränkt ist, sondern wahrscheinlich in sämtlichen nicht-lymphatischen Zellen auftritt und so wahrscheinlich einen allgemeinen und körperweiten Schutzmechanismus darstellt. Dies warf die Frage auf, wie dieser weitreichende Effekt im gesamten Organismus reguliert wird.

4.3 Regulation der Proteasomen durch IFN γ und TNF α

Bekannte Botenstoffe des Immunsystems sind die proinflammatorischen Cytokine IFN γ und TNF α , die beide eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf die *L. monocytogenes* Infektion spielen: Tiere, denen diese Cytokine oder ihre Rezeptoren fehlen, überleben die *L. monocytogenes* Infektion nicht (Harty und Bevan, 1995; Huang et al., 1993; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993). Auf der Basis von Zellkulturexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass IFN γ und TNF α in vielen Zelltypen mehrere Proteine des MHC-Klasse-I Präsentationswegs induzieren, insbesondere die proteolytisch aktiven Immuno-Untereinheiten der 20S Proteasomen (Groettrup et al., 1996a; Hallermalm et al., 2001; Ortiz-Navarrete et al., 1991).

Die Analyse der Proteasomen aus IFN γ -Rezeptor defizienten Tieren (I-Tieren) zeigte, dass die 20S Proteasomen der lymphatischen Gewebe die Immuno-Untereinheiten enthielten (**Abb. 29B, Abb. 30C**). Die densitometrische Auswertung der 2D-Gele von Dünndarmproteasomen ergab einen Anteil von 40% bis 50% Immunoproteasomen an der gesamten Proteasomenpräparation, wohingegen die Dünndarmpräparationen aus den Wildtyptieren ca. 60% Immunoproteasomen enthielten. Hieraus und aus ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Zusammensetzung von Milzproteasomen nach einer Pilzinfektion (Barton et al., 2002) lässt sich schließen, dass IFN γ nicht alleine für die konstante Expression der Immunoproteasomen in lymphatischen Geweben verantwortlich ist, da die I-Tiere – trotz ihres Unvermögens, auf IFN γ zu reagieren – in diesen Geweben mit funktionsfähigen Immunoproteasomen ausgestattet sind (**Abb. 22A**). Barton *et al.* konnten zudem nachweisen, dass auch Stat1-defiziente Tiere in der Milz Immuno-Untereinheiten besitzen. Somit ist die basale Expression der Immunoproteasomen in den lymphatischen Organen nur bedingt von dem durch IFN γ ausgelösten Signalweg abhängig. Offensichtlich reichten aber die 40% Immunoproteasomen aus dem Dünndarm der I-Tiere aus, um in den Funktionsanalysen eine deutlich erhöhte Generierung immunrelevanter Produkte gegenüber den Prozessierungsversuchen mit den Leber- und Colonproteasomen der I-Tiere zu erzeugen (**Abb. 22A, Abb. 29B**). Dies entspricht den im vorherigen Kapitel 4.2 diskutierten Ergebnissen mit den Leberproteasomen der Wildtypmäuse: Ein Anteil der Immunoproteasomen von knapp über 40% scheint einen funktionellen Schwellenwert hinsichtlich einer erhöhten Ektop- und Precursorbildung zu überschreiten.

Die nicht-lymphatischen Organe der I-Tiere exprimierten vor der Infektion fast keine Immuno-Untereinheiten, was sich nach der Infektion – im Gegensatz zu den Wildtyptieren – nur minimal, aber nicht signifikant änderte (**Abb. 29A, Abb. 30A,B**). Dies wurde auch bei IFN γ -defizienten Tieren von Barton *et al.* für Leber- sowie Lungenhomogenate nach der

Pilzinfektion gezeigt (Barton et al., 2002), und Khan *et al.* beschrieben für Leberproteasomen aus LCMV-infizierten IFN γ -defizienten Tieren ebenfalls eine deutlich reduzierte Zunahme der Immuno-Untereinheiten im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Khan et al., 2001). Die vorliegende Arbeit konnte darüber hinaus diese proteasomalen Strukturergebnisse mit den Funktionsanalysen durch *in vitro* Degradation des LLO-Substrates in einen physiologischen Zusammenhang bringen: Die Effizienz bei der Generierung von Epitop und Precursor durch Proteasomen, die aus den nicht-lymphatischen Geweben der I-Tiere isoliert wurden, blieb nach der Infektion unverändert niedrig (**Abb. 22A** und nicht gezeigt). Da bei diesem Tiermodell im Colon und der Leber keine signifikante strukturelle Veränderung der Proteasomen stattfand, blieb also ein durch die Infektion ausgelöster funktioneller Effekt auf die Proteasomen der I-Tieren aus. Hieraus kann gefolgert werden, dass in den nicht-lymphatischen Organen IFN γ für die nach der Infektion induzierte hohe Expression der Immuno-Untereinheiten unbedingt notwendig ist, und dass diese Induktion nicht stattfindet, wenn das IFN γ -Signal wegfällt.

Die Analyse der I-Tierproteasomen bestätigt ebenfalls eindrucksvoll die schon in Kapitel 4.2 geschilderte Beobachtung, dass der direkte Kontakt einer Zelle mit den von *L. monocytogenes* sekretierten Proteinen keine Bedingung für die Expression der Immuno-Untereinheiten sein kann: Auch in den I-Tieren hatten die sehr starke *L. monocytogenes* Besiedlung der Leber und der Befall des Colons keinerlei Auswirkung auf die Regulation der Proteasomen (**Abb. 8B, Abb. 22A, Abb. 29A, Abb. 30A**).

Erstaunlicherweise verhielten sich die Gewebeproteasomen der TNF α Rezeptor-defizienten Mäuse (T-Tiere) nach der *L. monocytogenes* Infektion vollständig wie die der Wildtypiere: Zum einen nahm nach der Infektion in den nicht-lymphatischen Geweben der T-Tiere der Immunoproteasomenanteil zu, was mit einer Steigerung der *in vitro* Produktion der immunrelevanten Fragmente gekoppelt war (**Abb. 22B, Abb. 29A, Abb. 30A**). Zum anderen stieg der auch vor der Infektion schon hohe immunoproteasomale Anteil sowie die Generierung der immunrelevanten Peptide in den lymphatischen Geweben der T-Tiere nicht weiter an (**Abb. 22B, Abb. 29B, Abb. 30C**). Wie klar erkennbar ist, hat das Fehlen des TNF α -Signalweges offensichtlich keine, eine Defizienz des IFN γ -Signalweges hingegen eine sehr drastische Konsequenz für die Induktion der Immuno-Untereinheiten. Dies bedeutet, dass *in vivo* TNF α einen Verlust von IFN γ in Bezug auf funktionelle Immunoproteasomen nicht zu kompensieren vermag, obwohl in Zellkulturexperimenten die Stimulation mit TNF α zu einer – wenn auch schwächern – Induktion der Immuno-Untereinheiten führen kann (Hallermalm et al., 2001; Loukissa et al., 2000; Raasi et al., 1999). Die durch das Vorhandensein mehrerer verschiedener Cytokine komplexe Regulationssituation *in vivo* kann also hinsichtlich der Immunoproteasomen nur durch IFN γ maßgeblich beeinflusst werden.

Der nicht-vorhandene Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ im Kontrast zu dem deutlichen Effekt von $\text{IFN}\gamma$ auf die Bildung von Immunoproteasomen war auch deshalb überraschend, weil die T-Tiere für die *L. monocytogenes* Infektion viel anfälliger sind als die I-Tiere. Die Überlebenschance in den frühen Stadien nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* ist demnach nicht an das Vorhandensein von Immunoproteasomen und im weiteren Sinne an die Präsentation der MHC-Klasse-I Epitope gekoppelt. Tatsächlich überleben Mäuse, die keine CTLs und andere Zellen der adaptiven Immunabwehr besitzen, eine *L. monocytogenes* Infektion, können diese aber nie gänzlich eliminieren (Bancroft et al., 1991; Nickol und Bonventre, 1977). Die vollständige Genesung basiert hauptsächlich auf der Funktion der CTLs und damit auf einer effektiven Präsentation der MHC-Klasse-I Epitope (Ladel et al., 1994). Messbare Frequenzen der spezifischen CTLs – auch gegen das Epitop des LLO-Substrates – sind erst ab Tag 5 bis 6 nach der Infektion zu detektieren (Dr. Ulrich Steinhoff, MPIIB, persönliche Mitteilung) wohingegen funktionsfähige Immunoproteasomen schon am Tag 2 p.i. in den nicht-lymphatischen Zellen nachzuweisen waren (**Abb. 31**, **Abb. 32**). In dieser frühen Phase nach der Infektion vollzieht sich die Aktivierung von naïven T-Zellen (Wong und Pamer, 2003), an welcher die nicht-lymphatischen Zellen jedoch nicht beteiligt sind. Unter diesem Aspekt scheinen die Immunoproteasomen und die damit einhergehende verbesserte Epitopgenerierung einige Tage „zu früh“ exprimiert zu werden, da der Höhepunkt der adaptiven Immunantwort erst am Tag 8 nach der Infektion erreicht ist. In einer Sekundärinfektion expandieren die spezifischen Gedächtnis-CTLs der protektiven Immunität jedoch viel schneller und sind schon am Tag 3 p.i. messbar gestiegen (Badovinac et al., 2004). Somit lässt sich vermuten, dass die frühzeitige Expression der Immuno-Untereinheiten in einer Primärinfektion eventuell nicht nutzbringend ist, aber besonders bei der Reinfektion eine wichtige die CTLs unterstützende Rolle spielt. In einem sekundären Infektionsmodell, in dem die Immunoproteasomen induzierbar sind, ließe sich diese Hypothese eingehender untersuchen.

Durch $\text{IFN}\gamma$ -Injektion in Mäuse wurde in einer vor kurzem erschienenen Arbeit gezeigt, dass $\text{IFN}\gamma$ die Induktion der Immuno-Untereinheiten *in vivo* stimulieren kann (Nil et al., 2004). Des Weiteren besitzt der Verlust des Rezeptors für die Typ I Interferone $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\beta$ keinen Einfluss auf die Expression der Immuno-Untereinheiten nach der Infektion (Khan et al., 2001), sondern zeichnet sich sogar durch eine größere Resistenz der Mäuse gegenüber *L. monocytogenes* aus, deren Ursachen jedoch noch ungeklärt sind (Auerbuch et al., 2004; Carrero et al., 2004). Insgesamt betrachtet, ist also $\text{IFN}\gamma$ für die Bildung von Immunoproteasomen notwendig und ausreichend, weil die Injektionen von $\text{IFN}\gamma$ für die Stimulation der Immuno-Untereinheiten genügen und keine der bisher untersuchten Rezeptor- und Cytokin-defizienten Mäusen einen den I-Tieren ähnlichen Mangel an Immunoproteasomen aufweisen.

4.4 Detaillierte Auswertung des Schnittverhaltens von konstitutiven und Immunproteasomen

Neben den 26S Proteasomen und den mit PA28 assoziierten 20S Proteasomen existieren in der Zelle auch freie 20S Proteasomen (Tanahashi et al., 2000; Yang et al., 1995). Da bei bestimmten Methoden der 20S Proteasomenpräparation, besonders unter Verwendung von Glycerol, die isolierten 20S Proteasomen nur eine geringe katalytische Aktivität aufweisen, wird im allgemeinen angenommen, dass freie 20S Proteasomen auch innerhalb der Zelle latent vorliegen (Coux et al., 1996). Unter diesem Aspekt erscheint es zunächst fraglich, ob sich die Ergebnisse von *in vitro* Prozessierungsexperimenten mit isolierten 20S Proteasomen auf die Situation in der Zelle anwenden lassen. Erstaunlicherweise zeigt jedoch der Vergleich der *in vitro* gewonnenen Prozessierungsdaten von Peptidsubstraten mit den *in vivo* Analysen durch CTL-Experimente eine eindrucksvolle Übereinstimmung zwischen dem Schnittverhalten isolierter 20S Proteasomen und dem des endogenen Proteasomensystems (Eggers et al., 1995; Schultz et al., 2002; Schwarz et al., 2000; Seifert et al., 2004; Sijts et al., 2000a; Sijts et al., 2000b; Sun et al., 2002). Hinzu kommt, dass ein Vorhersageprogramm für die Präsentation von MHC-Klasse-I Epitopen sehr gute Resultate erzielt, obwohl es kombiniert mit MHC-Klasse-I und TAP Bindungsexperimenten auf der *in vitro* Prozessierung von Proteinen durch 20S Proteasomen beruht (Peters et al., submitted). Zusätzlich steigt die Anzahl der Berichte, die zeigen, dass 20S Proteasomen auch in „latenter“ Form und ohne 19S Regulator oder PA28 in der Lage sind, vollständige Proteine zu degradieren (Orlowski und Wilk, 2003; Tenzer et al., 2004).

Kürzlich wurde für die 20S Proteasomen eine selbstständige Rolle im MHC-Klasse-I Präsentationsweg vorgeschlagen: Das Duale-Proteasomen-Modell postuliert, dass die 26S Proteasomen ubiquitinierte Substrate in längere Polypeptide spalten, die durch 20S Proteasomen und TPPII – eine Aminopeptidase mit der zusätzlichen Fähigkeit, auch endoproteolytisch nach Lysinresten zu schneiden (Geier et al., 1999; Seifert et al., 2003) – weiter zu Epitop und Precursor prozessiert werden (Kloetzel, 2004). Dieses Modell stützt sich neben der oben diskutierten *in vitro* / *in vivo* Übereinstimmung auch auf die Tatsache, dass es Beispiele gibt, in denen die 26S Proteasomen nicht vollständig prozessiv arbeiten und Polypeptide von mehr als 100 Aminosäuren generieren (Rape und Jentsch, 2004). Ferner ruft eine IFN γ -Stimulation der Zelle die Dephosphorylierung und dadurch die Destabilisierung von 26S Proteasomen hervor (Bose et al., 2004). Demnach scheint ein Anstieg der freien 20S Proteasomen zu den die MHC-Klasse-I Präsentation stimulierenden Vorgängen beizutragen. Ebenfalls für eine Funktion der 20S Proteasomen *in vivo* sprechen Versuchsergebnisse mit dem Proteasomeninhibitor 31 (PI31). *In vitro* ist PI31 ein potenter Inhibitor der 20S Proteasomen; die Überexpression in Zellen führt aber nicht zu einer Abnahme der

Proteindegradation oder zum Zellzyklusarrest, sondern wirkt sich nur negativ auf die MHC-Klasse-I Präsentation der Epitope aus (Zaiss et al., 2002). PI31 setzt also nach der Proteolyse durch die 26S Proteasomen direkt bei den 20S Proteasomen an, um den MHC-Klasse-I Präsentationsweg zu beeinflussen.

Die dargelegten Gründe deuten darauf hin, dass der *in vitro* Prozessierungsansatz, der anstelle von 26S Proteasomen und polyubiquitinierten nativen Proteinen nur die 20S Proteasomen und Polypeptidsubstrate enthält, vielleicht nicht nur ein Modellsystem ist. Im Gegenteil, es wäre denkbar, dass dieser Ansatz durchaus den wahren Bedingungen in der Zelle sehr nahe kommt, wenn es darum geht, die proteasomale Generierung der Epitope und Precursor zu untersuchen. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet wird die detaillierte Analyse der Prozessierungsprodukte aus den Verdauansätzen mit 20S Proteasomen besonders aufschlussreich. Dies gilt vor allem in Bezug auf die durch eine Infektion induzierten proteasomalen Veränderungen bei der Bildung immunrelevanter Peptide, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass in den analysierten *in vitro* Prozessierungsansätzen die Immunoproteasomen die drei Polypeptide LLO-Substrat, Hsp60-Substrat und pp89-Substrat schneller umsetzten als die konstitutiven Proteasomen (**Abb. 33** und nicht gezeigt), was sich mit den Resultaten anderer Arbeiten deckt (Knuehl et al., 2001; Peters et al., 2002; Sijts et al., 2000b; Tenzer et al., 2004). Allerdings wurde hierdurch die Frage aufgeworfen, ob die zwischen konstitutiven und Immunoproteasomen verzeichneten Unterschiede eventuell nur darauf zurückzuführen waren, dass die Immunoproteasomen die Substrate rascher degradierten und daher auch die Produkte schneller generierten. Um eine möglicherweise ebenfalls vorhandene Änderung der Schnittpräferenz von dem erhöhten Substratumsatz zu trennen, wurde die Verhältnisbildung zwischen den immunrelevanten Fragmenten und den sogenannten Antitopen eingeführt. Als Antitope werden solche Fragmente bezeichnet, die durch eine Spaltung des Peptidsubstrates innerhalb der Epitopsequenz gebildet werden und dadurch eine Epitopgenerierung ausschließen. Sind Immunoproteasomen lediglich schneller, produzieren sie auch die Antitope zügiger, und somit bleibt das Epitop/Antitop-Verhältnis oder das Precursor/Antitop-Verhältnis zwischen den beiden Proteasomenarten konstant. Setzen Immunoproteasomen aber bevorzugt die immunrelevanten Fragmente frei, so steigen diese Verhältnisse an.

Eine Voraussetzung für die Verhältnisbildung ist, dass die massenspektrometrisch detektierten Intensitäten der analysierten Produkte linear zu ihren Konzentrationen ansteigen. In der Massenspektrometrie können jedoch die Signalintensitäten einiger Peptide durch das Vorhandensein anderer Peptide unterdrückt werden; ein Effekt, der im allgemeinen als „Suppression“ bekannt ist (Tang et al., 2004). Aus diesem Grund wurden Eichkurven für die

zu analysierenden Fragmente des LLO-Substrates erstellt, die sich dadurch auszeichneten, dass sie die unterschiedlichen Konzentrationen der zu analysierenden Produkte nicht einzeln, sondern zusammen in verschiedenen Mischungsverhältnissen enthielten (**Abb. 35**). Die Resultate bestätigten den Suppressions-Effekt, besonders für das in hoher Konzentration vorliegende Antitop. Im Bereich der normalerweise gemessenen Intensitäten allerdings zeigten die Eich-Intensitäten nur eine geringe Streuung und daher fast keine Suppression. Zudem verhielten sich die Eich-Intensitäten in diesem Bereich auch linear zu den eingesetzten Konzentrationen, was die Verhältnisbildung zwischen den immunrelevanten Fragmenten und dem Antitop in den *in vitro* Prozessierungen erlaubte. Die Eichgeraden zeigten ebenfalls, dass die Intensitäten für die analysierten Fragmente je nach eingesetzter Menge ungefähr gleich hoch waren. Eine Erklärung könnte sein, dass Epitop, Precursor und Antitop fast gleich lang sind sowie aus überlappenden Aminosäuresequenzen bestehen und deshalb ein unter Umständen ähnliches Ionisierungsverhalten in der ESI besaßen. Dies ermöglichte also nicht nur einen relativen sondern sogar einen absoluten Vergleich zwischen den interessanten Prozessierungsprodukten.

Prozessierungsansätze mit Proteasomenpräparationen, die überwiegend aus konstitutiven Proteasomen bestanden, enthielten in etwa so viel Epitop oder Precursor wie Antitop. Stieg indessen der Immunoproteasomengehalt in den Proteasomenpräparationen, erhöhte sich die Generierung der immunrelevanten Fragmente aus dem LLO-Substrat auf fast das dreifache der Antitopbildung (**Abb. 36**). Derselbe Verlauf wurde in Bezug auf zwei weitere Antitope des LLO-Substrates gefunden (nicht gezeigt). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Inkorporation der Immuno-Untereinheiten nicht nur zu einem akzelerierten Substratumsatz führte, sondern zusätzlich auch in einer Änderung der Schnittstellenpräferenzen bei der Prozessierung des LLO-Substrates resultierte. Die Immunoproteasomen förderten demnach die Bildung der immunrelevanten Fragmente gegenüber der Antitopgenerierung aus dem LLO-Substrat. Eine Begründung für dieses Ergebnis lässt sich aus den Sequenzhomologien der Untereinheiten und den bisher veröffentlichten Kristallstrukturdaten nicht ableiten. Sie besagen lediglich, dass das aktive Zentrum der $\beta 1$ -Untereinheit in einer polaren Nische liegt, wohingegen in der korrespondierenden Immuno-Untereinheit $i\beta 1$ die entsprechende Nische durch den Austausch von zwei Aminosäuren apolar ist (Groll et al., 1997), was die geringere Caspase-ähnliche Aktivität der Immunoproteasomen verursachen kann (Gaczynska et al., 1993; Kuckelkorn et al., 1995). Für eine Erklärung des unterschiedlichen Schnittverhaltens wurde daher ein Vorhersageprogramm für die proteasomalen Schnittstellen (ProteaSMM) herangezogen, das an ca. 400 Epitopen getestet wurde (Peters et al., submitted). Die Analyse des LLO-Substrates mittels dieses Programms ergab, dass die Wahrscheinlichkeit einer immunoproteasomalen Spaltung am C-Terminus der immunrelevanten Fragmente Epitop 6-14 und Precursor 4-14 deutlich erhöht ist, da an Position 14 ein Leucin steht (Leu14). An Position 12 im LLO-Substrat – drei Aminosäuren vor Leu14 – liegt ein Valin

(Val12), welches ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Spaltung nach Leu14 durch Immunoproteasomen besitzt. Dieses Val12 bildet den C-Terminus des Antitops 4-12. Im Gegensatz zu den konstitutiven Proteasomen lehnen Immunoproteasomen in dem theoretischen Vorhersagemodell die Spaltung nach einem Valin eher ab. Die negative Auswirkung des Val12 auf die Antitopbildung durch Immunoproteasomen gekoppelt mit dem positiven Effekt von Leu14 und Val12 auf Bildung der immunrelevanten Peptide durch die Immunoproteasomen könnte die Verhältnisänderung zwischen diesen Fragmenten auf theoretischer Basis erklären.

Für die immunrelevanten Produkte und ein Antitop aus dem Hsp60-Substrat (nicht gezeigt) sowie dem pp89-Substrat (Peters et al., 2002) konnte ebenfalls die lineare Zunahme der massenspektrometrischen Intensitäten mit den Eichkonzentrationen nachgewiesen werden. Die Auswertung der Prozessierungsversuche mit Hsp60- und pp89-Substrat mittels der Verhältnisbildung zwischen den immunrelevanten Fragmenten und mehreren Antitopen ergab keine Änderung der Schnittpräferenzen durch konstitutive und Immunoproteasomen (nicht gezeigt). Bei diesen Substraten scheint die effizientere Generierung der Epitope und Precursor auf die Beschleunigung der Proteolyse beschränkt zu sein. Doch auch die schnellere Epitopgenerierung kann zu einer verbesserten Epitoppräsentation auf MHC-Klasse-I Molekülen führen. Das zeigt sich in der Hsp60-spezifischen CTL-Erkennung von Zellen des Immunoproteasom-haltigen Dünndarms und den nicht durch die CTLs erkannten Leberzellen, die hauptsächlich konstitutive Proteasomen exprimieren (Kuckelkorn et al., 2002). Zudem spiegelt sich dies ebenfalls in dem Vorhersageprogramm für die proteasomale Spaltung von Substraten wider (Peters et al., submitted).

Hinsichtlich der Änderung bei der Schnittstellenpräferenz in den pp89- und LLO-Substraten kamen vor kurzem Peters *et al.* (Peters et al., 2002) durch eine andere Auswertungsmethode als die der Verhältnisbildung zu den gleichen Ergebnissen wie die vorliegende Arbeit. In der Veröffentlichung wurden die Degradationsprodukte durch die Massen-Balance-Methode quantifiziert und die so erhaltenen Produktmengen miteinander verglichen. Eine Grundvoraussetzung für die Methode ist die vollständige Erfassung sämtlicher entstandener Fragmente. Diese ist jedoch nicht gewährleistet, da auf Grund ihrer intrinsischen Eigenschaften nicht alle Peptide gleich gut in der HPLC-ESI-Ionenfalle detektiert werden können (Cech und Enke, 2001). Ein Beispiel dafür ist mit der *in vitro* Degradation des Hsp60-Substrates gegeben: Obwohl große Mengen der für Hsp60 immunrelevanten Produkte generiert wurden, und auch die korrespondierenden N-terminalen Produkte zu finden waren, ließen sich keine C-terminalen Produkte massenspektrometrisch nachweisen (nicht gezeigt eigene Daten und Dr. Ulrike Kuckelkorn, persönliche Mitteilung). Deswegen ist die Massen-Balance-Methode nur sehr bedingt anwendbar. Im Gegensatz dazu kann die hier vorgestellte Vorgehensweise des Epitop/Antitop- oder Precursor/Antitop-Verhältnisses für alle Substrate

eingesetzt werden, bei denen auch ein Schnitt innerhalb der Epitopsequenz möglich ist. Die Existenz eines solchen Schnittes kann wegen der grundsätzlich relativ unspezifischen Spaltpräferenzen der 20S Proteasomen für jedes Epitop angenommen werden und ist neben der in dieser Arbeit untersuchten Epitope schon für viele andere genau analysierte Epitope gezeigt worden (Alvarez et al., 2001; Chapatte et al., 2004; Schultz et al., 2002; Sijts et al., 2000a; Sun et al., 2002; Theobald et al., 1998). Da Eichreihen in der massenspektrometrischen Analyse nur für die interessierenden Fragmente erstellt werden müssen, ist der zusätzliche experimentelle Aufwand einfach abzuschätzen und deswegen die genaue Analyse der Schnittstellenpräferenz durch die Verhältnis-Methode sehr gut durchführbar.

Eine Änderung der Spaltpräferenzen könnte zu der Nutzung neuer Schnittstellen durch die Immunoproteasomen führen. Die umfangreiche massenspektrometrische Analyse aller detektierbaren Prozessierungsprodukte des LLO-Substrates ergab, dass sämtliche von konstitutiven Proteasomen hergestellten Peptide auch in den Ansätzen mit Immunoproteasomen detektiert wurden (**Abb. 37**). Durch Immunoproteasomen wurden jedoch zwei Produkte gebildet, die in den Prozessierungsexperimenten mit konstitutiven Proteasomen nicht nachgewiesen werden konnten. Eine genaue Charakterisierung dieser zwei Fragmente deckte allerdings auf, dass die Schnitte, die diese Fragmente generierten, sehr wohl auch von konstitutiven Proteasomen ausgeführt wurden. Möglicherweise liegen die durch eine Kombination dieser Schnitte entstehenden Fragmente bei konstitutiven Proteasomen unterhalb des massenspektrometrischen Detektionslimits. Erst die Änderung der Spaltpräferenzen hebt die generierte Fragmentmenge auf ein nachweisbares Niveau. Für das LLO-Substrat konnten also keine ausschließlich durch die Immunoproteasomen genutzten Schnittstellen gefunden werden. Weitere Analysen müssen klären, ob sich diese Aussage auch auf andere Substrate anwenden lässt.

Die erstmals in dieser Ausführlichkeit erstellte Auswertung der *in vitro* Prozessierungsexperimente gibt detaillierten Aufschluss über die funktionellen Unterschiede zwischen konstitutiven Proteasomen und Immunoproteasomen. Letztere zeichnen sich demnach gegenüber den konstitutiven Proteasomen in einigen Fällen durch eine geänderte Schnittstellenpräferenz aus und generell durch einen erhöhten Umsatz der Substrate.

Mit den genannten Aspekten sind Immunoproteasomen speziell an der nach einer Infektion wichtigen gesteigerten Epitopräsentation auf MHC-Klasse-I Molekülen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Zusammenhang besonders ersichtlich, da die aus mit *L. monocytogenes* infizierten Mäusen isolierten 20S Proteasomen das listerielle LLO-Epitop –

sowie ein zweites Epitop und mehrere Precursor – deutlich effizienter generierten. Durch die IFN γ -abhängige Expression der Immuno-Untereinheiten übt die Infektion also einen starken regulativen Einfluss auf die proteasomale Struktur und Funktion in den nicht-lymphatischen Organen aus. Ob sich dieser Einfluss ebenfalls auf Regulation durch posttranslationale Modifikationen wie die O-Glycosylierung und die Phosphorylierung erstreckt, wird der Gegenstand weiterer Analysen sein.

5 LITERATUR

- Aichele, P.; Zinke, J.; Grode, L.; Schwendener, R. A.; Kaufmann, S. H. und Seiler, P. (2003): Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses, *J Immunol* 171 [3], Seite 1148-55.
- Aki, M.; Shimbara, N.; Takashina, M.; Akiyama, K.; Kagawa, S.; Tamura, T.; Tanahashi, N.; Yoshimura, T.; Tanaka, K. und Ichihara, A. (1994): Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes, *J Biochem (Tokyo)* 115 [2], Seite 257-69.
- Akiyama, K.; Kagawa, S.; Tamura, T.; Shimbara, N.; Takashina, M.; Kristensen, P.; Hendil, K. B.; Tanaka, K. und Ichihara, A. (1994): Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing, *FEBS Lett* 343 [1], Seite 85-8.
- Alvarez, P.; Leguizamon, M. S.; Buscaglia, C. A.; Pitcovsky, T. A. und Campetella, O. (2001): Multiple overlapping epitopes in the repetitive unit of the shed acute-phase antigen from *Trypanosoma cruzi* enhance its immunogenic properties, *Infect Immun* 69 [12], Seite 7946-9.
- Ando, K.; Guidotti, LG; Cerny, A.; Ishikawa, T und Chisari, FV (1994): CTL access to tissue antigen is restricted in vivo, *J Immunol* 153 [2], Seite 482-488. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/153/2/482>
- Auerbuch, V.; Brockstedt, D. G.; Meyer-Morse, N.; O'Riordan, M. und Portnoy, D. A. (2004): Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*, *J Exp Med* 200 [4], Seite 527-33.
- Bachmair, A.; Finley, D. und Varshavsky, A. (1986): In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue, *Science* 234 [4773], Seite 179-86.
- Badovinac, V. P.; Porter, B. B. und Harty, J. T. (2004): CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation, *Nat Immunol* 5 [8], Seite 809-17.
- Bancroft, G. J.; Schreiber, R. D. und Unanue, E. R. (1991): Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse, *Immunol Rev* 124, Seite 5-24.
- Barton, L. F.; Cruz, M.; Rangwala, R.; Deepe, G. S., Jr. und Monaco, J. J. (2002): Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection, *J Immunol* 169 [6], Seite 3046-52.
- Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; van Hall, T.; Neisig, A.; Sijts, A.; Camps, M.; Kloetzel, P. M.; Neeffjes, J. J.; Melief, C. J. und Ossendorp, F. (2000): Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site, *J Immunol* 164 [4], Seite 1898-905.
- Beninga, J.; Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1998): Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase, *J Biol Chem* 273 [30], Seite 18734-42.
- Berruti, G. und Martegani, E. (2004): The Deubiquitinating Enzyme mUBPy Interacts with the Sperm-Specific Molecular Chaperone MSJ-1: The Relation with the Proteasome, Acrosome, and Centrosome in Mouse Male Germ Cells, *Biol Reprod*.
- Bielecki, J.; Youngman, P.; Connelly, P. und Portnoy, D. A. (1990): *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells, *Nature* 345 [6271], Seite 175-6.
- Boehmelt, G.; Wakeham, A.; Elia, A.; Sasaki, T.; Plyte, S.; Potter, J.; Yang, Y.; Tsang, E.; Ruland, J.; Iscove, N. N.; Dennis, J. W. und Mak, T. W. (2000): Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells, *Embo J* 19 [19], Seite 5092-104.

- Boes, B.; Hengel, H.; Ruppert, T.; Multhaupt, G.; Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M. (1994): Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes, *J Exp Med* 179 [3], Seite 901-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8113682
- Bose, S.; Brooks, P.; Mason, G. G. und Rivett, A. J. (2001): gamma-Interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation, *Biochem J* 353 [Pt 2], Seite 291-7.
- Bose, S.; Stratford, F. L.; Broadfoot, K. I.; Mason, G. G. und Rivett, A. J. (2004): Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon, *Biochem J* 378 [Pt 1], Seite 177-84.
- Braun, B. C.; Glickman, M.; Kraft, R.; Dahlmann, B.; Kloetzel, P. M.; Finley, D. und Schmidt, M. (1999): The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity, *Nat Cell Biol* 1 [4], Seite 221-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10559920
- Bubert, A.; Kuhn, M.; Goebel, W. und Kohler, S. (1992): Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species, *J Bacteriol* 174 [24], Seite 8166-71.
- Bulteau, A. L.; Lundberg, K. C.; Humphries, K. M.; Sadek, H. A.; Szweda, P. A.; Friguet, B. und Szweda, L. I. (2001): Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion, *J Biol Chem* 276 [32], Seite 30057-63. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/276/32/30057>
- Busch, D. H.; Kerksiek, K. und Pamer, E. G. (1999): Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the in vivo T-cell response to bacterial infection, *Immunol Rev* 172, Seite 163-9.
- Cardozo, C.; Eleuteri, A. M. und Orlowski, M. (1995): Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver. Changes in LMP7 and the component necessary for expression of the chymotrypsin-like activity, *J Biol Chem* 270 [38], Seite 22645-51.
- Carrero, J. A.; Calderon, B. und Unanue, E. R. (2004): Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection, *J Exp Med* 200 [4], Seite 535-40.
- Cascio, P.; Call, M.; Petre, B. M.; Walz, T. und Goldberg, A. L. (2002): Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes, *Embo J* 21 [11], Seite 2636-45.
- Cascio, P.; Hilton, C.; Kisselev, A. F.; Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (2001): 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide, *Embo J* 20 [10], Seite 2357-66. URL: <http://www.emboj.org/cgi/content/full/20/10/2357>
- Cech, N. B. und Enke, C. G. (2001): Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom Rev* 20 [6], Seite 362-87.
- Chapatte, L.; Servis, C.; Valmori, D.; Burlet-Schiltz, O.; Dayer, J.; Monsarrat, B.; Romero, P. und Levy, F. (2004): Final Antigenic Melan-A Peptides Produced Directly by the Proteasomes Are Preferentially Selected for Presentation by HLA-A*0201 in Melanoma Cells, *J Immunol* 173 [10], Seite 6033-40.
- Chen, P. und Hochstrasser, M. (1996): Autocatalytic Subunit Processing Couples Active Site Formation in the 20S Proteasome to Completion of Assembly, *Cell* 86 [6], Seite 961-972. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-418PWG3-G/2/beb66a38f47206a4be8cb9eaa79a7509>
- Cheng, X.; Cole, R. N.; Zaia, J. und Hart, G. W. (2000): Alternative O-glycosylation/O-

- phosphorylation of the murine estrogen receptor beta, *Biochemistry* 39 [38], Seite 11609-20.
- Comer, F. I. und Hart, G. W. (2001): Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II, *Biochemistry* 40 [26], Seite 7845-52.
- Coux, O.; Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem* 65, Seite 801-47.
- Cuervo, A. M.; Palmer, A.; Rivett, A. J. und Knecht, E. (1995): Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver, *Eur J Biochem* 227 [3], Seite 792-800.
- Dahlmann, B.; Kopp, F.; Kuehn, L.; Niedel, B.; Pfeifer, G.; Hegerl, R. und Baumeister, W. (1989): The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria, *FEBS Lett* 251 [1-2], Seite 125-31.
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. und Kuehn, L. (2001): Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle, *Biochimie* 83 [3-4], Seite 295-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11295489
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kuehn, L.; Merforth, S. und Kloetzel, P. M. (2000): Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties, *J Mol Biol* 303 [5], Seite 643-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11061965
- Davy, A.; Bello, P.; Thierry-Mieg, N.; Vaglio, P.; Hitti, J.; Doucette-Stamm, L.; Thierry-Mieg, D.; Reboul, J.; Boulton, S.; Walhout, A. J.; Coux, O. und Vidal, M. (2001): A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome, *EMBO Rep* 2 [9], Seite 821-8.
- De Mot, R.; Nagy, I.; Walz, J. und Baumeister, W. (1999): Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes, *Trends Microbiol* 7 [2], Seite 88-92.
- Decatur, A. L. und Portnoy, D. A. (2000): A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity, *Science* 290 [5493], Seite 992-5.
- Demasi, M.; Shringarpure, R. und Davies, K. J. (2001): Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors, *Arch Biochem Biophys* 389 [2], Seite 254-63.
- Demasi, M.; Silva, G. M. und Netto, L. E. (2003): 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated, *J Biol Chem* 278 [1], Seite 679-85.
- Deveraux, Q.; Ustrell, V.; Pickart, C. und Rechsteiner, M. (1994): A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates, *J Biol Chem* 269 [10], Seite 7059-61.
- Dick, T. P.; Ruppert, T.; Groettrup, M.; Kloetzel, P. M.; Kuehn, L.; Koszinowski, U. H.; Stevanovic, S.; Schild, H. und Rammensee, H. G. (1996): Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands, *Cell* 86 [2], Seite 253-62. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4195BWM-C/2/ecddf944e6ce28148aaa039a894ae5df>
- Driscoll, J.; Brown, M. G.; Finley, D. und Monaco, J. J. (1993): MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome, *Nature* 365 [6443], Seite 262-4.
- Edelson, B. T. und Unanue, E. R. (2000): Immunity to *Listeria* infection, *Curr Opin Immunol* 12 [4], Seite 425-31. URL: <http://www.biomednet.com/article/imc409>
- Egerer, K.; Kuckelkorn, U.; Rudolph, P. E.; Ruckert, J. C.; Dorner, T.; Burmester, G. R.; Kloetzel, P. M. und Feist, E. (2002): Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases, *J Rheumatol* 29 [10], Seite 2045-52.
- Eggers, M.; Boes-Fabian, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. und Koszinowski, U. H. (1995):

- The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides, *J Exp Med* 182 [6], Seite 1865-70.
- Eleuteri, A. M.; Kohanski, R. A.; Cardozo, C. und Orłowski, M. (1997): Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity, *J Biol Chem* 272 [18], Seite 11824-31.
- Fehling, H. J.; Swat, W.; Laplace, C.; Kuhn, R.; Rajewsky, K.; Müller, U. und von Boehmer, H. (1994): MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7, *Science* 265 [5176], Seite 1234-7.
- Fernandez Murray, Pedro; Pardo, Patricia S.; Zelada, Alicia M. und Passeron, Susana (2002): In vivo and in vitro phosphorylation of *Candida albicans* 20S proteasome, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 404 [1], Seite 116-125. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WB5-468TCS6-K/2/5843035e468fcffad04ce3de39a65419>
- Ferrell, K.; Wilkinson, C. R.; Dubiel, W. und Gordon, C. (2000): Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem, *Trends Biochem Sci* 25 [2], Seite 83-8.
- Frentzel, S.; Pesold-Hurt, B.; Seelig, A. und Klotzel, P. M. (1994): 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes, *J Mol Biol* 236 [4], Seite 975-81.
- Gaczynska, M.; Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1993): Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes, *Nature* 365 [6443], Seite 264-7.
- Gaczynska, M.; Rock, K. L.; Spies, T. und Goldberg, A. L. (1994): Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [20], Seite 9213-7.
- Gao, Y.; Wells, L.; Comer, F. I.; Parker, G. J. und Hart, G. W. (2001): Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain, *J Biol Chem* 276 [13], Seite 9838-45.
- Geginat, G.; Schenk, S.; Skoberne, M.; Goebel, W. und Hof, H. (2001): A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*, *J Immunol* 166 [3], Seite 1877-84. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/166/3/1877>
- Geier, E.; Pfeifer, G.; Wilm, M.; Lucchiari-Hartz, M.; Baumeister, W.; Eichmann, K. und Niedermann, G. (1999): A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome, *Science* 283 [5404], Seite 978-81.
- Glickman, M. H. und Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* 82 [2], Seite 373-428.
- Gregory, S. H.; Sagnimeni, A. J. und Wing, E. J. (1996): Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils, *J Immunol* 157 [6], Seite 2514-20.
- Greis, K. D.; Hayes, B. K.; Comer, F. I.; Kirk, M.; Barnes, S.; Lowary, T. L. und Hart, G. W. (1996): Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycopeptides by beta-elimination and tandem electrospray mass spectrometry, *Anal Biochem* 234 [1], Seite 38-49.
- Griffin, T. A.; Nandi, D.; Cruz, M.; Fehling, H. J.; Kaer, L. V.; Monaco, J. J. und Colbert, R. A. (1998): Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits, *J Exp Med* 187 [1], Seite 97-104.
- Groettrup, M.; Kraft, R.; Kostka, S.; Standera, S.; Stohwasser, R. und Klotzel, P. M.

- (1996a): A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome, *Eur J Immunol* 26 [4], Seite 863-9.
- Groettrup, M.; Soza, A.; Eggers, M.; Kuehn, L.; Dick, T. P.; Schild, H.; Rammensee, H. G.; Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M. (1996b): A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation, *Nature* 381 [6578], Seite 166-8.
- Groettrup, M.; Standera, S.; Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [17], Seite 8970-5.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. und Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle, *Nat Struct Biol* 7 [11], Seite 1062-7.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D. und Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386 [6624], Seite 463-71.
- Groll, M. und Huber, R. (2003): Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle, *Int J Biochem Cell Biol* 35 [5], Seite 606-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12672453
- Hallermalm, K.; Seki, K.; Wei, C.; Castelli, C.; Rivoltini, L.; Kiessling, R. und Levitskaya, J. (2001): Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface, *Blood* 98 [4], Seite 1108-15.
- Hart, G. W.; Greis, K. D.; Dong, L. Y.; Blomberg, M. A.; Chou, T. Y.; Jiang, M. S.; Roquemoire, E. P.; Snow, D. M.; Kreppel, L. K.; Cole, R. N. und et al. (1995): O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation, *Adv Exp Med Biol* 376, Seite 115-23.
- Harty, J. T. und Bevan, M. J. (1995): Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma, *Immunity* 3 [1], Seite 109-17.
- Harty, J. T.; Schreiber, R. D. und Bevan, M. J. (1992): CD8 T cells can protect against an intracellular bacterium in an interferon gamma-independent fashion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [23], Seite 11612-6.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2004): Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum, *Annu Rev Biochem* 73, Seite 1019-49.
- Hendil, K. B.; Khan, S. und Tanaka, K. (1998): Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes, *Biochem J* 332 (Pt 3), Seite 749-54.
- Holt, G. D. und Hart, G. W. (1986): The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc, *J Biol Chem* 261 [17], Seite 8049-57.
- Huang, S.; Hendriks, W.; Althage, A.; Hemmi, S.; Bluethmann, H.; Kamijo, R.; Vilcek, J.; Zinkernagel, R. M. und Aguet, M. (1993): Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor, *Science* 259 [5102], Seite 1742-5.
- Huleatt, J. W.; Pilip, I.; Kerksiek, K. und Pamer, E. G. (2001): Intestinal and splenic T cell responses to enteric *Listeria monocytogenes* infection: distinct repertoires of responding CD8 T lymphocytes, *J Immunol* 166 [6], Seite 4065-73.
- Iwafune, Y.; Kawasaki, H. und Hirano, H. (2002): Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome, *Electrophoresis* 23 [2], Seite 329-38.
- Jiang, X.; Gregory, S. H. und Wing, E. J. (1997): Immune CD8+ T lymphocytes lyse *Listeria monocytogenes*-infected hepatocytes by a classical MHC class I-restricted mechanism, *J Immunol* 158 [1], Seite 287-93.
- Kamemura, K.; Hayes, B. K.; Comer, F. I. und Hart, G. W. (2002): Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins:

- alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens, *J Biol Chem* 277 [21], Seite 19229-35.
- Kania, M. A.; Demartino, G. N.; Baumeister, W. und Goldberg, A. L. (1996): The proteasome subunit, C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator, *Eur J Biochem* 236 [2], Seite 510-6.
- Khan, S.; van den Broek, M.; Schwarz, K.; de Giuli, R.; Diener, P. A. und Groettrup, M. (2001): Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver, *J Immunol* 167 [12], Seite 6859-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739503
- Kimura, Y.; Saeki, Y.; Yokosawa, H.; Polevoda, B.; Sherman, F. und Hirano, H. (2003): N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome, *Arch Biochem Biophys* 409 [2], Seite 341-8.
- Kimura, Y.; Takaoka, M.; Tanaka, S.; Sassa, H.; Tanaka, K.; Polevoda, B.; Sherman, F. und Hirano, H. (2000): N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome, *J Biol Chem* 275 [7], Seite 4635-9. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/275/7/4635>
- Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M. und Goldberg, A. L. (1999): The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation, *J Biol Chem* 274 [6], Seite 3363-71.
- Kisselev, A. F.; Kaganovich, D. und Goldberg, A. L. (2002): Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings, *J Biol Chem* 277 [25], Seite 22260-70.
- Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], Seite 179-87.
- Kloetzel, P. M. (2004): Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII, *Nat Immunol* 5 [7], Seite 661-9.
- Kloetzel, P. M. und Ossendorp, F. (2004): Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation, *Curr Opin Immunol* 16 [1], Seite 76-81.
- Knolle, P. A. und Gerken, G. (2000): Local control of the immune response in the liver, *Immunol Rev* 174, Seite 21-34.
- Knolle, P. A.; Germann, T.; Treichel, U.; Uhrig, A.; Schmitt, E.; Hegenbarth, S.; Lohse, A. W. und Gerken, G. (1999): Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells, *J Immunol* 162 [3], Seite 1401-7.
- Knuehl, C.; Spee, P.; Ruppert, T.; Kuckelkorn, U.; Henklein, P.; Neefjes, J. und Kloetzel, P. M. (2001): The murine cytomegalovirus pp89 immunodominant H-2Ld epitope is generated and translocated into the endoplasmic reticulum as an 11-mer precursor peptide, *J Immunol* 167 [3], Seite 1515-21.
- Kocks, C.; Gouin, E.; Tabouret, M.; Berche, P.; Ohayon, H. und Cossart, P. (1992): L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein, *Cell* 68 [3], Seite 521-31.
- Kreppel, L. K.; Blomberg, M. A. und Hart, G. W. (1997): Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats, *J Biol Chem* 272 [14], Seite 9308-15.
- Kreppel, L. K. und Hart, G. W. (1999): Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats, *J Biol Chem* 274 [45], Seite 32015-22.

- Kuckelkorn, U.; Frentzel, S.; Kraft, R.; Kostka, S.; Groettrup, M. und Kloetzel, P. M. (1995): Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma, *Eur J Immunol* 25 [9], Seite 2605-11.
- Kuckelkorn, U.; Ruppert, T.; Strehl, B.; Jungblut, P. R.; Zimny-Arndt, U.; Lamer, S.; Prinz, I.; Drung, I.; Kloetzel, P. M.; Kaufmann, S. H. und Steinhoff, U. (2002): Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity, *J Exp Med* 195 [8], Seite 983-90.
- Kursar, M.; Bonhagen, K.; Kohler, A.; Kamradt, T.; Kaufmann, S. H. und Mittrucker, H. W. (2002): Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection, *J Immunol* 168 [12], Seite 6382-7.
- Ladel, CH; Flesch, IE; Arnoldi, J und Kaufmann, SH (1994): Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection [published erratum appears in *J Immunol* 1995 Apr 15;154(8):4223], *J Immunol* 153 [7], Seite 3116-3122. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/153/7/3116>
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-5.
- Lautscham, G.; Haigh, T.; Mayrhofer, S.; Taylor, G.; Croom-Carter, D.; Leese, A.; Gadola, S.; Cerundolo, V.; Rickinson, A. und Blake, N. (2003): Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2, *J Virol* 77 [4], Seite 2757-61.
- Lefebvre, T.; Alonso, C.; Mahboub, S.; Dupire, M. J.; Zanetta, J. P.; Caillet-Boudin, M. L. und Michalski, J. C. (1999): Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line, *Biochim Biophys Acta* 1472 [1-2], Seite 71-81.
- Lefebvre, T.; Ferreira, S.; Dupont-Wallois, L.; Bussiere, T.; Dupire, M. J.; Delacourte, A.; Michalski, J. C. und Caillet-Boudin, M. L. (2003): Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization, *Biochim Biophys Acta* 1619 [2], Seite 167-76.
- Li, J.; Gao, X.; Ortega, J.; Nazif, T.; Joss, L.; Bogyo, M.; Steven, A. C. und Rechsteiner, M. (2001): Lysine 188 substitutions convert the pattern of proteasome activation by REGgamma to that of REGs alpha and beta, *Embo J* 20 [13], Seite 3359-69.
- Limmer, A.; Ohl, J.; Kurts, C.; Ljunggren, H. G.; Reiss, Y.; Groettrup, M.; Momburg, F.; Arnold, B. und Knolle, P. A. (2000): Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance, *Nat Med* 6 [12], Seite 1348-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11100119
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998): *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Loukissa, A.; Cardozo, C.; Altschuller-Felberg, C. und Nelson, J. E. (2000): Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity, *Cytokine* 12 [9], Seite 1326-30.
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W. und Huber, R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science* 268 [5210], Seite 533-9.
- Lubas, W. A.; Frank, D. W.; Krause, M. und Hanover, J. A. (1997): O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats, *J Biol Chem* 272 [14], Seite 9316-24.
- Macagno, A.; Gilliet, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; Nestle, F. O. und Groettrup, M. (1999): Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation, *Eur J Immunol* 29 [12], Seite 4037-42. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10602014
- Macagno, A.; Kuehn, L.; de Giuli, R. und Groettrup, M. (2001): Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation, *Eur J Immunol* 31 [11], Seite 3271-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11745344
- Mason, G. G.; Hendil, K. B. und Rivett, A. J. (1996): Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity, *Eur J Biochem* 238 [2], Seite 453-62.
- Mason, G. G.; Murray, R. Z.; Pappin, D. und Rivett, A. J. (1998): Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome, *FEBS Lett* 430 [3], Seite 269-74.
- Masopust, D.; Vezys, V.; Marzo, A. L. und Lefrancois, L. (2001): Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue, *Science* 291 [5512], Seite 2413-7.
- Matsuoka, T.; Dellamanna, D.; Isaacs, J.; Carroll, J.A.; Kreppel, L.K.; Cole, R.N.; Johnsson, G.V.W. und G.W., Hart (in prep).
- McGregor, D. D.; Koster, F. T. und Mackaness, G. B. (1970): The short lived small lymphocyte as a mediator of cellular immunity, *Nature* 228 [5274], Seite 855-6.
- Mizushima, N.; Ohsumi, Y. und Yoshimori, T. (2002): Autophagosome formation in mammalian cells, *Cell Struct Funct* 27 [6], Seite 421-9.
- Moors, M. A.; Auerbuch, V. und Portnoy, D. A. (1999): Stability of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells is regulated by the N-end rule pathway, *Cell Microbiol* 1 [3], Seite 249-57.
- Morales, P.; Pizarro, E.; Kong, M. und Jara, M. (2004): Extracellular localization of proteasomes in human sperm, *Mol Reprod Dev* 68 [1], Seite 115-24.
- Morel, S.; Levy, F.; Burlet-Schiltz, O.; Brasseur, F.; Probst-Kepper, M.; Peitrequin, A. L.; Monsarrat, B.; Van Velthoven, R.; Cerottini, J. C.; Boon, T.; Gairin, J. E. und Van den Eynde, B. J. (2000): Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells, *Immunity* 12 [1], Seite 107-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10661410
- Mountz, J. D.; Wu, J.; Cheng, J. und Zhou, T. (1994): Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis, *Arthritis Rheum* 37 [10], Seite 1415-20.
- Murata, S.; Udono, H.; Tanahashi, N.; Hamada, N.; Watanabe, K.; Adachi, K.; Yamano, T.; Yui, K.; Kobayashi, N.; Kasahara, M.; Tanaka, K. und Chiba, T. (2001): Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta, *Embo J* 20 [21], Seite 5898-907.
- Nickol, A. D. und Bonventre, P. F. (1977): Anomalous high native resistance to athymic mice to bacterial pathogens, *Infect Immun* 18 [3], Seite 636-45.
- Niedermann, G.; Butz, S.; Ihlenfeldt, H. G.; Grimm, R.; Lucchiari, M.; Hoschutzky, H.; Jung, G.; Maier, B. und Eichmann, K. (1995): Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules, *Immunity* 2 [3], Seite 289-99.
- Nil, A.; Firat, E.; Sobek, V.; Eichmann, K. und Niedermann, G. (2004): Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets, *Eur J Immunol* 34 [10], Seite 2681-9.
- Noda, C.; Tanahashi, N.; Shimbara, N.; Hendil, K. B. und Tanaka, K. (2000): Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats,

- Biochem Biophys Res Commun 277 [2], Seite 348-54.
- Nussbaum, A. K.; Dick, T. P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (1998): Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [21], Seite 12504-9.
- Okada, K.; Wangpoengtrakul, C.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Tanaka, K. und Uchida, K. (1999): 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules, *J Biol Chem* 274 [34], Seite 23787-93.
- Orlowski, M. und Wilk, S. (2000): Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex, *Arch Biochem Biophys* 383 [1], Seite 1-16.
- Orlowski, M. und Wilk, S. (2003): Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome, *Arch Biochem Biophys* 415 [1], Seite 1-5.
- Ortiz-Navarrete, V.; Seelig, A.; Gernold, M.; Frentzel, S.; Kloetzel, P. M. und Hammerling, G. J. (1991): Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex, *Nature* 353 [6345], Seite 662-4.
- Ortmann, B.; Copeman, J.; Lehner, P. J.; Sadasivan, B.; Herberg, J. A.; Grandea, A. G.; Riddell, S. R.; Tampe, R.; Spies, T.; Trowsdale, J. und Cresswell, P. (1997): A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes, *Science* 277 [5330], Seite 1306-9.
- Ossendorp, F.; Eggers, M.; Neisig, A.; Ruppert, T.; Groettrup, M.; Sijts, A.; Mengede, E.; Kloetzel, P. M.; Neefjes, J.; Koszinowski, U. und Melief, C. (1996): A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation, *Immunity* 5 [2], Seite 115-24.
- Pamer, E. G. (2004): Immune responses to *Listeria monocytogenes*, *Nat Rev Immunol* 4 [10], Seite 812-23.
- Peters, B.; Bulik, S.; Tampe, R.; Van Endert, P. M. und Holzhutter, H. G. (2003): Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors, *J Immunol* 171 [4], Seite 1741-9.
- Peters, B.; Janek, K.; Kuckelkorn, U. und Holzhutter, H. G. (2002): Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation, *J Mol Biol* 318 [3], Seite 847-62.
- Peters, B.; Tenzer, S.; Bulik, S.; Schoor, O.; Lemmel, C.; Schatz, M.; Kloetzel, P. M.; Rammensee, H. G.; Holzhutter, H. G. und Schild, H. (submitted): Modelling the MHC class-I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP-transport and MHC binding, in preparation.
- Peters, J. M.; Cejka, Z.; Harris, J. R.; Kleinschmidt, J. A. und Baumeister, W. (1993): Structural features of the 26 S proteasome complex, *J Mol Biol* 234 [4], Seite 932-7.
- Pfeffer, K.; Matsuyama, T.; Kundig, T. M.; Wakeham, A.; Kishihara, K.; Shahinian, A.; Wiegmann, K.; Ohashi, P. S.; Kronke, M. und Mak, T. W. (1993): Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection, *Cell* 73 [3], Seite 457-67.
- Pickart, C. M. (2004): Back to the future with ubiquitin, *Cell* 116 [2], Seite 181-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744430
- Portnoy, D. A.; Auerbuch, V. und Glomski, I. J. (2002): The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity, *J Cell Biol* 158 [3], Seite 409-14.
- Raasi, S.; Schmidtke, G.; de Giuli, R. und Groettrup, M. (1999): A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha, *Eur J Immunol* 29 [12], Seite 4030-6. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10602013

- Ramalho-Santos, J.; Schatten, G. und Moreno, R. D. (2002): Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction, *Biol Reprod* 67 [4], Seite 1043-51.
- Rammensee, H. G.; Friede, T. und Stevanović, S. (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing, *Immunogenetics* 41 [4], Seite 178-228.
- Rape, M. und Jentsch, S. (2004): Productive RUPTure: activation of transcription factors by proteasomal processing, *Biochim Biophys Acta* 1695 [1-3], Seite 209-13.
- Realini, C.; Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K. und Rechsteiner, M. (1994): Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease, *J Biol Chem* 269 [32], Seite 20727-32.
- Rechsteiner, M.; Realini, C. und Ustrell, V. (2000): The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation, *Biochem J* 345 Pt 1, Seite 1-15.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem Sci* 21 [7], Seite 267-71.
- Reits, E.; Neijssen, J.; Herberts, C.; Benckhuijsen, W.; Janssen, L.; Drijfhout, J. W. und Neefjes, J. (2004): A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation, *Immunity* 20 [4], Seite 495-506.
- Rock, K. L.; York, I. A. und Goldberg, A. L. (2004): Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation, *Nat Immunol* 5 [7], Seite 670-7.
- Rogers, H. W.; Callery, M. P.; Deck, B. und Unanue, E. R. (1996): *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes, *J Immunol* 156 [2], Seite 679-84.
- Roquemore, E. P.; Chou, T. Y. und Hart, G. W. (1994): Detection of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on cytoplasmic and nuclear proteins, *Methods Enzymol* 230, Seite 443-60.
- Rothe, J.; Lesslauer, W.; Lotscher, H.; Lang, Y.; Koebel, P.; Kontgen, F.; Althage, A.; Zinkernagel, R.; Steinmetz, M. und Bluethmann, H. (1993): Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*, *Nature* 364 [6440], Seite 798-802.
- Rouquette, C.; de Chastellier, C.; Nair, S. und Berche, P. (1998): The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages, *Mol Microbiol* 27 [6], Seite 1235-45.
- Saric, T.; Chang, S. C.; Hattori, A.; York, I. A.; Markant, S.; Rock, K. L.; Tsujimoto, M. und Goldberg, A. L. (2002): An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat Immunol* 3 [12], Seite 1169-76.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem* 166 [2], Seite 368-79.
- Schmid, H. P.; Vallon, R.; Tomek, W.; Kreutzer-Schmid, C.; Pouch, M. N.; Badaoui, S.; Boissonnet, G.; Briand, M.; Briand, Y. und Buri, J. (1993): Glycosylation and deglycosylation of proteasomes (prosome) from calf-liver cells: high abundance of neuraminic acid, *Biochimie* 75 [10], Seite 905-10.
- Schmidtke, G.; Eggers, M.; Ruppert, T.; Groettrup, M.; Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M. (1998): Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein, *J Exp Med* 187 [10], Seite 1641-6.
- Schmidtke, G.; Kraft, R.; Kostka, S.; Henklein, P.; Frommel, C.; Lowe, J.; Huber, R.; Kloetzel, P. M. und Schmidt, M. (1996): Analysis of mammalian 20S proteasome

- biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis, *Embo J* 15 [24], Seite 6887-98. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9003765
- Schrattenholz, A. (2001): Methoden der Proteomforschung, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer.
- Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T. und Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* 75 [2], Seite 163-89.
- Schubert, U.; Anton, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W. und Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 [6779], Seite 770-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10783891
- Schultz, E. S.; Chapiro, J.; Lurquin, C.; Claverol, S.; Burlet-Schiltz, O.; Warnier, G.; Russo, V.; Morel, S.; Levy, F.; Boon, T.; Van den Eynde, B. J. und van der Bruggen, P. (2002): The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome, *J Exp Med* 195 [4], Seite 391-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11854353
- Schwartz, A. L. und Ciechanover, A. (1999): The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases, *Annu Rev Med* 50, Seite 57-74.
- Schwarz, K.; van Den Broek, M.; Kostka, S.; Kraft, R.; Soza, A.; Schmidtke, G.; Kloetzel, P. M. und Groettrup, M. (2000): Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope, *J Immunol* 165 [2], Seite 768-78.
- Seifert, U.; Liermann, H.; Racanelli, V.; Halenius, A.; Wiese, M.; Wedemeyer, H.; Ruppert, T.; Rispeter, K.; Henklein, P.; Sijts, A.; Hengel, H.; Kloetzel, P. M. und Rehmann, B. (2004): Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing, *J Clin Invest* 114 [2], Seite 250-9.
- Seifert, U.; Maranon, C.; Shmueli, A.; Desoutter, J. F.; Wesoloski, L.; Janek, K.; Henklein, P.; Diescher, S.; Andrieu, M.; de la Salle, H.; Weinschenk, T.; Schild, H.; Laderach, D.; Galy, A.; Haas, G.; Kloetzel, P. M.; Reiss, Y. und Hosmalin, A. (2003): An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope, *Nat Immunol* 4 [4], Seite 375-9.
- Seo, J. und Lee, K. J. (2004): Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches, *J Biochem Mol Biol* 37 [1], Seite 35-44.
- Shedlock, D. J. und Shen, H. (2003): Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory, *Science* 300 [5617], Seite 337-9.
- Shen, H.; Miller, J. F.; Fan, X.; Kolwyck, D.; Ahmed, R. und Harty, J. T. (1998): Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity, *Cell* 92 [4], Seite 535-45.
- Shen, Y.; Naujokas, M.; Park, M. und Ireton, K. (2000): InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase, *Cell* 103 [3], Seite 501-10.
- Shepherd, J. C.; Schumacher, T. N.; Ashton-Rickardt, P. G.; Imaeda, S.; Ploegh, H. L.; Janeway, C. A., Jr. und Tonegawa, S. (1993): TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective, *Cell* 74 [3], Seite 577-84.
- Sijts, A. J.; Pilip, I. und Pamer, E. G. (1997): The *Listeria monocytogenes*-secreted p60 protein is an N-end rule substrate in the cytosol of infected cells. Implications for

- major histocompatibility complex class I antigen processing of bacterial proteins, *J Biol Chem* 272 [31], Seite 19261-8.
- Sijts, A. J.; Ruppert, T.; Rehmann, B.; Schmidt, M.; Koszinowski, U. und Kloetzel, P. M. (2000a): Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes, *J Exp Med* 191 [3], Seite 503-14.
- Sijts, A. J.; Standera, S.; Toes, R. E.; Ruppert, T.; Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; Ossendorp, F. A.; Melief, C. J. und Kloetzel, P. M. (2000b): MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells, *J Immunol* 164 [9], Seite 4500-6.
- Sijts, A. J.; Villanueva, M. S. und Pamer, E. G. (1996): CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen, *J Immunol* 156 [4], Seite 1497-503.
- Sijts, A.; Zaiss, D. und Kloetzel, P. M. (2001): The role of the ubiquitin-proteasome pathway in MHC class I antigen processing: implications for vaccine design, *Curr Mol Med* 1 [6], Seite 665-76.
- Slawson, C. und Hart, G. W. (2003): Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation, *Curr Opin Struct Biol* 13 [5], Seite 631-6.
- Steinhoff, U.; Brinkmann, V.; Klemm, U.; Aichele, P.; Seiler, P.; Brandt, U.; Bland, P. W.; Prinz, I.; Zugel, U. und Kaufmann, S. H. (1999): Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells, *Immunity* 11 [3], Seite 349-58.
- Stevanovic, S. und Schild, H. (1999): Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules, *Semin Immunol* 11 [6], Seite 375-84.
- Stohwasser, R.; Holzhutter, H. G.; Lehmann, U.; Henklein, P. und Kloetzel, P. M. (2003): Hepatitis B virus HBx peptide 116-138 and proteasome activator PA28 compete for binding to the proteasome alpha4/MC6 subunit, *Biol Chem* 384 [1], Seite 39-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12674498
- Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M. (1996): Cytokine induced changes in proteasome subunit composition are concentration dependent, *Biol Chem* 377 [9], Seite 571-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9067255
- Stohwasser, R.; Salzmann, U.; Giesebrecht, J.; Kloetzel, P. M. und Holzhutter, H. G. (2000): Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28, *Eur J Biochem* 267 [20], Seite 6221-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11012676
- Sumegi, M.; Hunyadi-Gulyas, E.; Medzihradszky, K. F. und Udvardy, A. (2003): 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Biophys Res Commun* 312 [4], Seite 1284-9.
- Sun, J. C. und Bevan, M. J. (2003): Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help, *Science* 300 [5617], Seite 339-42.
- Sun, Y.; Sijts, A. J.; Song, M.; Janek, K.; Nussbaum, A. K.; Kral, S.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Paschen, A.; Schild, H.; Kloetzel, P. M. und Schadendorf, D. (2002): Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells, *Cancer Res* 62 [10], Seite 2875-82.
- Sykulev, Y.; Joo, M.; Vturina, I.; Tsomides, T. J. und Eisen, H. N. (1996): Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response, *Immunity* 4 [6], Seite 565-71.

- Tanahashi, N.; Murakami, Y.; Minami, Y.; Shimbara, N.; Hendil, K. B. und Tanaka, K. (2000): Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis, *J Biol Chem* 275 [19], Seite 14336-45.
- Tanaka, K.; Tamura, T.; Yoshimura, T. und Ichihara, A. (1992): Proteasomes: protein and gene structures, *New Biol* 4 [3], Seite 173-87.
- Tang, K.; Page, J. S. und Smith, R. D. (2004): Charge competition and the linear dynamic range of detection in electrospray ionization mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom* 15 [10], Seite 1416-23.
- Tanioka, Toshihiro; Hattori, Akira; Masuda, Shinako; Nomura, Yoshihiro; Nakayama, Hiroshi; Mizutani, Shigehiko und Tsujimoto, Masafumi (2003): Human Leukocyte-derived Arginine Aminopeptidase: THE THIRD MEMBER OF THE OXYTOCINASE SUBFAMILY OF AMINOPEPTIDASES, *J. Biol. Chem.* 278 [34], Seite 32275-32283. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/278/34/32275>
- Tenzer, S.; Stoltze, L.; Schonfisch, B.; Dengjel, J.; Muller, M.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (2004): Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility, *J Immunol* 172 [2], Seite 1083-91.
- Theobald, M.; Ruppert, T.; Kuckelkorn, U.; Hernandez, J.; Haussler, A.; Ferreira, E. A.; Liewer, U.; Biggs, J.; Levine, A. J.; Huber, C.; Koszinowski, U. H.; Kloetzel, P. M. und Sherman, L. A. (1998): The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope, *J Exp Med* 188 [6], Seite 1017-28.
- Tilney, L. G. und Portnoy, D. A. (1989): Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*, *J Cell Biol* 109 [4 Pt 1], Seite 1597-608.
- Toes, R. E.; Nussbaum, A. K.; Degermann, S.; Schirle, M.; Emmerich, N. P.; Kraft, M.; Laplace, C.; Zwinderman, A.; Dick, T. P.; Muller, J.; Schonfisch, B.; Schmid, C.; Fehling, H. J.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (2001): Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products, *J Exp Med* 194 [1], Seite 1-12. URL: <http://www.jem.org/cgi/content/abstract/194/1/1>
- Torres, C. R. und Hart, G. W. (1984): Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc, *J Biol Chem* 259 [5], Seite 3308-17.
- Ustrell, V.; Pratt, G. und Rechsteiner, M. (1995): Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [2], Seite 584-8.
- Van den Eynde, B. J. und Morel, S. (2001): Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome, *Curr Opin Immunol* 13 [2], Seite 147-53.
- van Hall, T.; Sijts, A.; Camps, M.; Offringa, R.; Melief, C.; Kloetzel, P. M. und Ossendorp, F. (2000): Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28, *J Exp Med* 192 [4], Seite 483-94.
- Van Kaer, L.; Ashton-Rickardt, P. G.; Eichelberger, M.; Gaczynska, M.; Nagashima, K.; Rock, K. L.; Goldberg, A. L.; Doherty, P. C. und Tonegawa, S. (1994): Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice, *Immunity* 1 [7], Seite 533-41.
- Varfolomeev, E. E. und Ashkenazi, A. (2004): Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?, *Cell* 116 [4], Seite 491-7.
- Varshavsky, A. (1997): The N-end rule pathway of protein degradation, *Genes Cells* 2 [1],

- Seite 13-28.
- Vazquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Gonzalez-Zorn, B.; Wehland, J. und Kreft, J. (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clin Microbiol Rev* 14 [3], Seite 584-640.
- Wehren, A.; Meyer, H. E.; Sobek, A.; Kloetzel, P. M. und Dahlmann, B. (1996): Phosphoamino acids in proteasome subunits, *Biol Chem* 377 [7-8], Seite 497-503.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8922284
- Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], Seite 169-78.
- Wells, L.; Gao, Y.; Mahoney, J. A.; Vosseller, K.; Chen, C.; Rosen, A. und Hart, G. W. (2002): Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase, *J Biol Chem* 277 [3], Seite 1755-61.
- Wells, L.; Kreppel, L. K.; Comer, F. I.; Wadzinski, B. E. und Hart, G. W. (2004): O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits, *J Biol Chem* 279 [37], Seite 38466-70.
- West, C. M.; Van Der Wel, H.; Sassi, S. und Gaucher, E. A. (2004): Cytoplasmic glycosylation of protein-hydroxyproline and its relationship to other glycosylation pathways, *Biochim Biophys Acta* 1673 [1-2], Seite 29-44.
- Whitby, F. G.; Masters, E. I.; Kramer, L.; Knowlton, J. R.; Yao, Y.; Wang, C. C. und Hill, C. P. (2000): Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators, *Nature* 408 [6808], Seite 115-20.
- Witt, E.; Zantopf, D.; Schmidt, M.; Kraft, R.; Kloetzel, P. M. und Kruger, E. (2000): Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes, *J Mol Biol* 301 [1], Seite 1-9.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10926487
- Wong, P. und Pamer, E. G. (2003): Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming, *Immunity* 18 [4], Seite 499-511.
- Yang, Y.; Fruh, K.; Ahn, K. und Peterson, P. A. (1995): In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing, *J Biol Chem* 270 [46], Seite 27687-94.
- Yoshida, Y.; Chiba, T.; Tokunaga, F.; Kawasaki, H.; Iwai, K.; Suzuki, T.; Ito, Y.; Matsuoka, K.; Yoshida, M.; Tanaka, K. und Tai, T. (2002): E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains, *Nature* 418 [6896], Seite 438-42.
- Yoshida, Y.; Tokunaga, F.; Chiba, T.; Iwai, K.; Tanaka, K. und Tai, T. (2003): Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains, *J Biol Chem* 278 [44], Seite 43877-84.
- Yoshimura, T.; Kameyama, K.; Takagi, T.; Ikai, A.; Tokunaga, F.; Koide, T.; Tanahashi, N.; Tamura, T.; Cejka, Z.; Baumeister, W. und et al. (1993): Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver, *J Struct Biol* 111 [3], Seite 200-11.
- Young, P.; Deveraux, Q.; Beal, R. E.; Pickart, C. M. und Rechsteiner, M. (1998): Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a, *J Biol Chem* 273 [10], Seite 5461-7.
- Zachara, N. E. und Hart, G. W. (2004): O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress, *Biochim Biophys Acta* 1673 [1-2], Seite 13-28.

-
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Kloetzel, P. M. und Sijts, A. J. (2002): PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [22], Seite 14344-9.
- Zhang, F.; Su, K.; Yang, X.; Bowe, D. B.; Paterson, A. J. und Kudlow, J. E. (2003): O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome, *Cell* 115 [6], Seite 715-25.
- Ziemba, H.; Bialy, L. P.; Fracki, S.; Bablok, L. und Wojcik, C. (2002): Proteasome localization and ultrastructure of spermatozoa from patients with varicocele--immunoelectron microscopic study, *Folia Histochem Cytobiol* 40 [2], Seite 169-70.

Abkürzungen

2D	zweidimensional
-βNA	-β-Naphtylamid
A280	Absorption bei 280 nm
AAF-	Alanin Alanin Phenylalanin-
Ak	Antikörper
-AMC	-7-Amido-4-Methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Boc-	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl-
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin Fraktion V
cfu	Kolonie-bildende-Einheiten
-CMK	-Chloromethylketone
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreito
ECL	„enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fötales Kälberserum
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
FU	Freie Universität Berlin
-GGL-	-Glycin Glycin Leucin-
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunden
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits- Chromatographie
Hsp60	Hitzeschockprotein 60
IFNγ	Interferon-γ

I-Tiere	C57Black/6 Mäuse mit Deletion des IFN γ -Rezeptorgens
kDa	Kilodalton
LCMV	lymphocytäre Choriomeningitis Virus
-LLE-	-Leucin Leucin Glutamat-
LLO	ListeriolysinO
-LLVY-	-Leucin Leucin Valin Tyrosin-
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/ Ionisation
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
min	Minuten
MPIIB	Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
NAG	N-Acetylglucosaminidase
NEPHGE	„Nonequilibrium pH Gradient Electrophoresis“
O-GlcNAc	Sauerstoff-gebundenes GlcNAc
OGT	O-GlcNAc Transferase
p.i.	post Infektion
PA28	Protasomen Aktivator 28
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBST	„Phosphate buffered Saline with Tween“
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PI31	Proteasomeninhibitor 31
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp89	Immediate Early Phosphoprotein 89
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur / reverse Transkription
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Suc-	Succinyl-
TAP	„Transporter associated with Antigen Processing“
TBST	„Tris buffered Saline with Tween“-
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-p ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF α	Tumor Nekrose Faktor- α
TOF	„Time of Flight“
TPPII	Tripeptidylpeptidase-II
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
T-Tiere	C57Black/6 Mäuse mit Deletionen der TNF-Rezeptorgene
U	Units
v/v	„Volume per Volume“

vergl.	vergleiche
-VGR-	-Valin Glycin Arginin -
w/v	„Weight per Volume“
WGA	„Wheat Germ Agglutinin
xg	x-fache Erdbeschleunigung (x 9,81 m/s)
Z-	Benzyloxycarbonyl-

Publikationen

Artikel

Strehl B, Joeris T, Rieger M, Steinhoff U, Kuckelkorn U, Kloetzel PM: Increased specificity of 20S proteasomes during *Listeria monocytogenes* infection only in non-lymphatic organs. in preparation

Kuckelkorn U, Ruppert T, **Strehl B**, Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Lamer S, Prinz I, Drung I, Kloetzel PM, Kaufmann SH, Steinhoff U (2002): Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. J Exp Med 195 (8), 983-90.

Strehl B, Holtzendorff J, Partensky F, and Hess WR (1999): A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: Lack of an intron in the gene for tRNA(Leu)UAA and a single copy of the rRNA operon. FEMS Microbiol Lett 181 (2), 261-6.

Poster

Strehl B, Joeris T, Rieger M, Kuckelkorn U, Kloetzel, P.-M Steinhoff U.; Changed specificity of 20S proteasomes during *Listeria monocytogenes* infection only in non-lymphatic organs; 12.-16. Juni 2004, Annual Meeting of IUBMB/ASBMB, Boston, USA

Strehl B, Kuckelkorn U, Kaufmann SH, Steinhoff U, Kloetzel PM; Organ-specific response of 20S proteasomes to *Listeria monocytogenes* infection; 23.-27. April 2003, The Ubiquitin Family, Cold Spring Harbor, USA

Strehl B, Kuckelkorn U, Ruppert T, Kaufmann SH, Kloetzel PM, Steinhoff U; Organ-specific processing by 20S proteasomes controls CD8+ T cell responses; 12.-15. Mai 2002, 3rd International Meeting on Antigen Processing and Presentation, Paris

Strehl B, Holtzendorff J, Partensky F, Rippka R, Hess WR; Analysis of genome size and expression in *Prochlorococcus marinus*; 13.-17. September 1999, 2nd European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria, Berlin

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel bedanken, der es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe unter wirklich hervorragenden Bedingungen zu arbeiten und zu diskutieren.

Meinen Betreuern Dr. Ulrike Kuckelkorn und PD Dr. Ulrich Steinhoff danke ich vor allem für die sehr gute Betreuung und das interessante Thema, welches ich selbständig und eigenverantwortlich bearbeiten konnte. Meinen besonderer Dank gilt Dr. Ulrike Kuckelkorn für die vielen Tipps und Tricks hinsichtlich der biochemischen Laborpraxis und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für sämtliche Fragestellungen hatte.

Vielen Dank den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Kuckelkorn-Labors Ilse Drung, Melanie Rieger, Moritz Wigand und Alexander Rabe für die tatkräftige praktische Unterstützung ganz besonders in den letzten Zügen meiner Arbeit sowie natürlich für die wunderbare und lustige Atmosphäre im Laboralltag.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe mukosale Immunologie, MPIIB, namentlich PD Dr. Ulrich Steinhoff, Dr. Silke Behnck-Knoblau, Dagmar Oberbeck-Müller, Daniel Seidel und Thorsten Joeris, die für einen reibungslosen Ablauf der Mausearbeiten sorgten, Immunofluoreszenzen produzierten und die Cytokin- und Bakterientiter-Bestimmungen durchführten. Außerdem danke ich ihnen für das gewährte Arbeitsplatz-Asyl, wenn ich am MPIIB war. Dr. Ursula Zimny-Arndt, MPIIB, danke ich für die 2D-Großgele, die man Spot für Spot übereinander legen kann.

Dr. Katharina Janek und Dr. Sabine Baumgart möchte ich für die schnelle Protein-identifizierungen mittels MALDI-TOF danken. Kathrin Textoris-Taube und Dr. Katharina Janek sei für die Einarbeitung an der HPLC-ESI-Ionenfalle gedankt und für den regen Austausch bezüglich neuer Erkenntnisse über den LCquan Step4. Für seine Einführung und Hilfe bei der Visual Basics Programmierung danke ich Dr. Björn Peters.

Mein großer Dank gilt Dr. Ulrike Seifert und der gesamten Besatzung des Doktorandenraums für Aufmunterungen und immerwährende Diskussionsbereitschaft. Bei Andrea Schulze, Melanie Rieger, Dr. Ulrike Kuckelkorn und Jenny Arnold möchte ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken. Ich spreche allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kloetzel meinen Dank aus, dass sie durch ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche und produktive Arbeitsklima zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern und Schwestern sowie Alexander danke ich besonders für die Unterstützung außerhalb des Labors.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, Januar 2005